

# Hashimotov tireoiditis : otkrivanje genetskih varijanti uključenih u razvoj bolesti

---

**Brčić, Luka**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:159020>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Luka Brčić**

**HASHIMOTOV TIREOIDITIS: OTKRIVANJE GENETSKIH VARIJANTI**  
**UKLJUČENIH U RAZVOJ BOLESTI**

**Doktorska disertacija**

**Mentor:**

**Izv. prof. dr. sc. Vesna Boraska Perica**

**Split, 2018.**

Ova doktorska disertacija izrađena je na Katedri za medicinsku biologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Istraživanje je provedeno u sklopu projekta „Cjelogenomska analiza povezanosti Hashimotovog tireoiditisa“ (projekt br. 4950) pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Vesne Boraske Perice. Projekt je financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici Vesni Boraski Perici na bezrezervnoj podršci i vodstvu prilikom provedbe istraživanja i izrade ove disertacije. Veliko vam hvala na svim dobronamjernim savjetima, znanju i radnim navikama te pozitivnim vrijednostima i etičkim načelima koje ste mi prenijeli. Hvala vam što ste mi omogućili da se usavršim kao znanstvenik, ali i kao osoba. Posebno vam zahvaljujem na pruženoj potpori, prijateljstvu i svim trenutcima koje smo zajedno proživjeli u posljednje četiri godine.*

*Zahvaljujem se i svim suradnicima i kolegama koji su svojim radom i znanjem doprinijeli provedbi ovog istraživanja. Posebno se zahvaljujem Ani Barić, Veseli Torlak Lovrić i profesoru Anti Pundi i svim ostalim suradnicima s Odjela za nuklearnu medicinu, KBC-a Split. Zahvaljujem se i profesorima Ozrenu Polašku, Maji Barbalić i Tatijani Zemunik i ostalim kolegama s Medicinskog fakulteta u Splitu.*

*Zahvaljujem se i profesorima Damiru Sapunaru i Liviji Puljak na pruženoj prilici za studiranje na poslijediplomskom studiju TRIBE te na korisnim savjetima i prenesenom znanju.*

*Posebno se zahvaljujem i svim kolegama i prijateljima s Katedre za medicinsku biologiju.*

*Zahvaljujem se i svim ostalim prijateljima i dragim osobama koji su mi bili velika potpora i radost u životu. Ne želim nikoga poimence izdvajati, znam da ćete se i sami znati prepoznati u ovim riječima.*

*Veliko hvala mojem najdražem bratu Držislavu i najdražoj sestri Mislavi što su me „istrpjeli“ u formativnim godinama i omogućili da postanem osoba kakva danas jesam. Hvala vam i na Dori, Antei, Karlu, Dominiku i Sari koji mi pružaju veliku sreću i koje, kao i vas dvoje, neizmjereno volim!*

*Na kraju, najveće hvala mojim najvećim životnim uzorima, mojim dragim roditeljima. Hvala vam na neizmjerljivoj ljubavi, sreći i osmijehu kojeg ste mi pružali tokom cijelog života. Hvala vam na nemjerljivom trudu koji ste uložili u moj odgoj. Bez vas ovo ništa ne bi bilo moguće. Oduvijek ste mi bili najveća snaga i potpora u životu i snažan zamašnjak da radosno i ustrajno kročim kroz život i uspješno savladavam sve prepreke. Nadam se da ću jednoga dana biti barem upola dobar roditelj i prijatelj svojoj djeci kao što ste to vi meni.*

*Znam da jedna zvijezda sada svijetli jače od drugih, beskonačnim zrakama ponosa...*

## POPIS POKRATA

T<sub>3</sub> – trijodtironin

T<sub>4</sub> – tiroksin

MIT – monojodtirozin

DIT – dijodtirozin

TSH – tireotropin

TBG - globulin koji veže tiroksin

TTR – transtiretin

TRH – tireoliberin

TSAt – stimulirajuća protutijela protiv TSH receptora

HT – Hashimotov tireoiditis

TgAt – protutijela protiv tireoglobulina

TPOAt – protutijela protiv štitne peroksidaze

IGg – imunoglobulin razreda G

LT<sub>4</sub> – levotiroksin

SNP – polimorfizam jednog nukleotida

GWAS – cjelogenomska studija povezanosti

LD – neravnoteža vezanosti

GRS – genetski rizični skor

KBC – Klinički bolnički centar

ETA – Europska zajednica za štitnjaču

MDS – višedimenzionalna metoda skaliranja

SE – standardna greška

OI – omjer izgleda

IP – interval pouzdanosti

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Štitnjača .....	2
1.1.1. Anatomija štitnjače .....	2
1.1.2. Histologija štitnjače.....	3
1.1.3. Fiziologija štitnjače.....	4
1.1.4. Bolesti štitnjače.....	7
1.2. Hashimotov tireoiditis (HT) .....	10
1.2.1. Epidemiologija HT-a .....	10
1.2.2. Etiopatogeneza HT-a.....	11
1.2.3. Klinička slika HT-a.....	13
1.2.4. Dijagnoza HT-a .....	14
1.2.5. Liječenje HT-a.....	15
1.3. Genetske studije povezanosti .....	16
1.3.1. Kandidatne genetske studije povezanosti .....	17
1.3.2. Cjelogenomske studije povezanosti .....	17
1.4. Genetska pozadina HT-a.....	18
<b>2. CILJ RADA I HIPOTEZE.....</b>	<b>23</b>
<b>3. ISPITANICI I POSTUPCI.....</b>	<b>25</b>
3.1. Ispitanici.....	26
3.1.1. Početna skupina .....	26
3.1.2. Replikacijske skupine .....	28
3.2. Materijali i postupci.....	28
3.2.1. Početna skupina – biokemijska mjerenja, izolacija DNA .....	28
3.2.2. Početna skupina – genotipiziranje.....	29

3.2.3. Početna skupina – kontrola kvalitete .....	29
3.2.4. Početna skupina – imputacija genotipova .....	40
3.2.5. Početna skupina – cjelogenomska analiza povezanosti HT-a .....	45
3.2.6. Replikacijske skupine – biokemijska mjerenja, izolacija DNA.....	46
3.2.7. Replikacijske skupine – genotipiziranje i analiza povezanosti odabranih genetskih varijanti.....	47
3.2.8. Meta-analiza između početne skupine i replikacijskih skupina.....	49
3.2.9. Analiza genetskog rizičnog skora .....	50
3.2.10. Evaluacija povezanosti HLA regije i HT-a .....	51
3.2.11. Analiza rezultata prethodno objavljenih studija.....	51
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>53</b>
4.1. Rezultati cjelogenomske analize povezanosti HT-a u početnoj skupini.....	54
4.2. Rezultati meta-analize .....	54
4.3. Rezultati analize GRS-a .....	61
4.4. Evaluacija povezanosti HLA regije i HT-a .....	61
4.5. Analiza rezultata prethodno objavljenih studija .....	64
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>70</b>
5.1. <i>SDK2</i> genomska regija .....	71
5.2. <i>GNA14</i> genomska regija .....	72
5.3. <i>IP6K3</i> genomska regija .....	73
5.4. Genetski rizični skor.....	74
5.5. <i>HLA</i> genomska regija .....	75
5.6. Genomske regije iz prethodno objavljenih studija.....	76
5.7. Ograničenja i prednosti studije .....	78
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>80</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>83</b>



<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>94</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>96</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>98</b>
<b>11. DODATAK.....</b>	<b>104</b>
11.1. Dodatak 1 – informirani pristanak.....	105
11.2. Dodatak 2 – potvrda etičkog povjerenstva 1 .....	108
11.3. Dodatak 3 – potvrda etičkog povjerenstva 2 .....	109

## **1. UVOD**

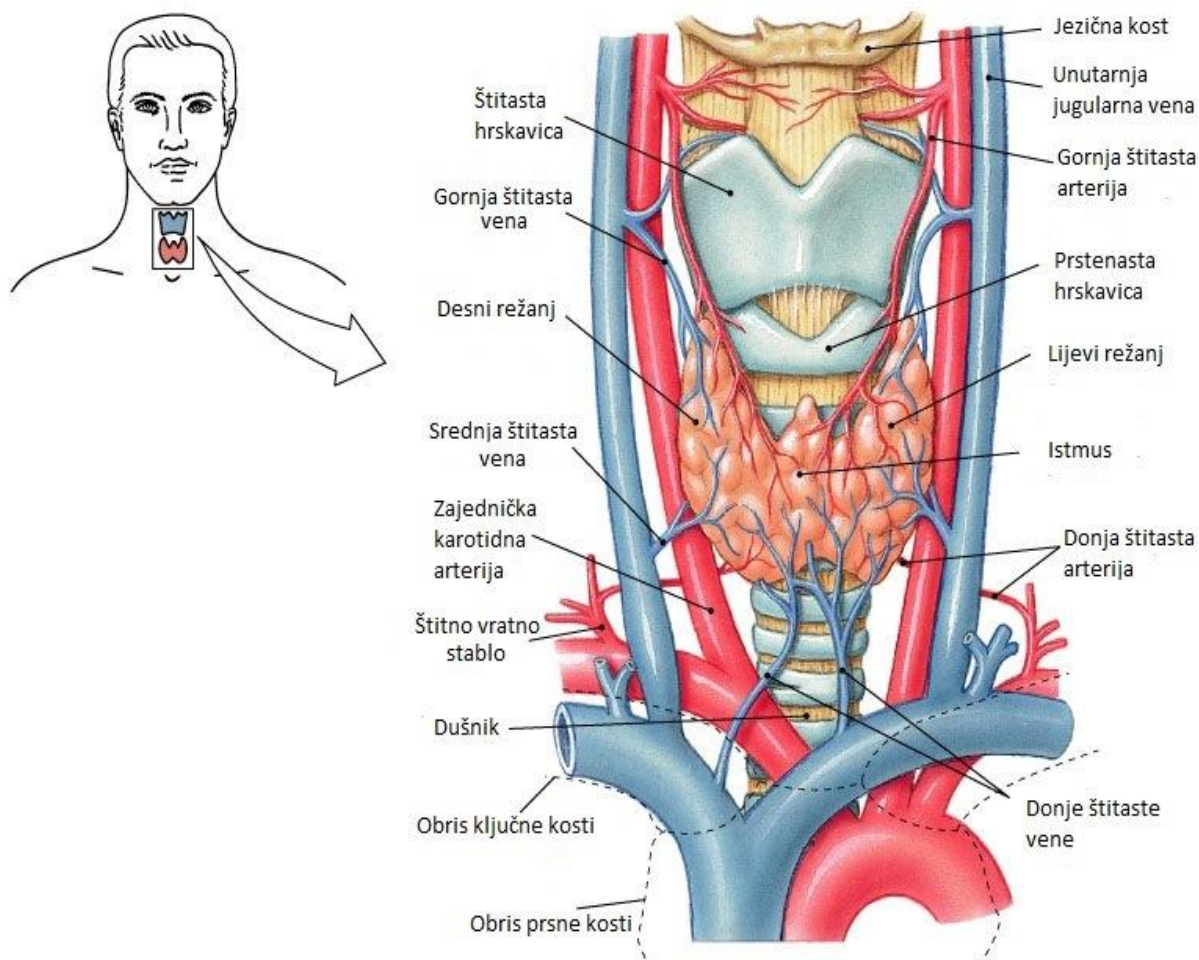
## 1.1. Štitnjača

### 1.1.1. Anatomija štitnjače

Štitnjača (lat. *glandula thyreoidea*) je najveća žlijezda s unutarnjim izlučivanjem čija prosječna masa u odraslih ljudi iznosi od 15 do 20 grama, a prosječni volumen od 15 do 30 cm<sup>3</sup> (1, 2). Smještena je u prednjem dijelu vrata, u razini donjeg dijela grkljana i gornjeg dijela dušnika (3). Štitnjača se sastoji od lijevog i desnog režnja (lat. *lobus sinister* i *lobus dexter*) koji su međusobno povezani tankim i uskim dijelom, istmusom (lat. *isthmus glandulae thyreoideae*), što žlijezdi daje karakterističan oblik slova H ili leptira (slika 1) (4). Svaki režanj je u prosjeku duljine 4 cm, širine 2 cm i debljine 2-3 cm, dok je prosječna duljina istmusa otprilike 2 cm, širina također 2 cm, a debljina 2-6 mm (5). U otprilike 50% slučajeva, u štitnjači je prisutan i treći, piramidalni režanj (lat. *lobus pyramidalis*) koji polazi od istmusa ili jednog od režnjeva i proteže se sve do jezične kosti (4-6).

Štitnjača je obavijena dvjema ovojnica: vanjskom i unutarnjom. Vanjska ovojnica (lat. *capsula fibrosa*) je dio srednjeg lista vezivne vratne ovojnice, deblja je i obavija štitnjaču s prednje strane i s lateralnih strana. Vanjska ovojnica je čvrsto vezana s dušnikom i grkljanom, dok je s okolnim tvorbama slabije vezana, pa stoga sama štitnjača prati kretanje grkljana i dušnika i pomična je u odnosu na okolne tvorbe. Unutarnja ovojnica je tanja, obavija štitnjaču sa svih strana te čvrsto prijanja uz nju. Unutarnja ovojnica građena je od vezivnog tkiva iz kojeg se duboko u tkivo štitnjače pružaju vezivni tračci koji tkivo štitnjače dijele na sitne režnjiće (lat. *lobuli glandulae thyreoideae*). U prostoru između vanjske i unutarnje ovojnice nalaze se doštitne žlijezde (dvije gornje i dvije donje žlijezde), te štitaste arterije i vene čiji ogranci zajedno sa spomenutim vezivnim tračcima ulaze u tkivo štitnjače (3, 5).

Štitnjača je izrazito dobro prokrvljena, te je volumen krvi koji kroz štitnjaču proteče u minuti otprilike pet puta veći od njezine mase (2). Štitnjaču krvlju opskrbljuju dvije parne arterije, donja i gornja štitasta arterija (lat. *a. thyroidea inferior* i *a. thyroidea superior*). U otprilike 10% slučajeva prisutna je i peta krvna žila, najdonja štitasta arterija (lat. *a. thyroidea ima*). Iz štitnjače krv odvede gornje i srednje štitaste vene (lat. *v. thyroideae superiores* i *v. thyroideae mediae*) koje se ulijevaju u unutarnju jugularnu venu (lat. *v. jugularis interna*), te donja štitasta vena (lat. *v. thyroidea inferior*) koja se ulijeva u lijevu brahiocefaličnu venu (lat. *v. brachiocephalica sin.*) (slika 1) (4).



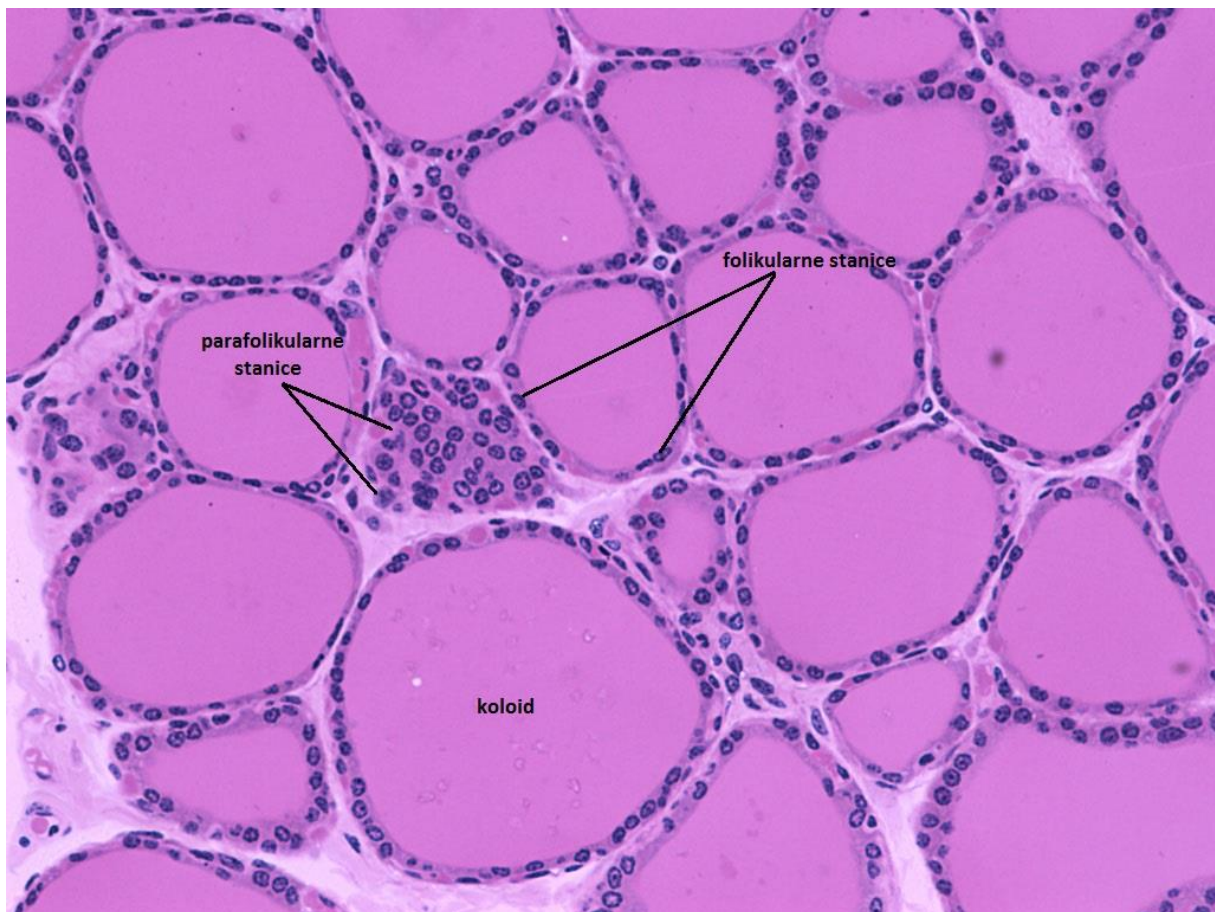
**Slika 1.** Anatomija štitnjače

Preuzeto s <https://www.thyroid.com.au/thyroid-cancer/papillary-thyroid-cancer/> i prilagođeno.

### 1.1.2. Histologija štitnjače

Osnovna jedinica građe tkiva štitnjače jest folikul. Folikuli su okrugle zatvorene strukture različite veličine, promjera od 100 do 300  $\mu\text{m}$ , obavijene gustom mrežom krvnih i limfnih kapilara. Folikuli su ispunjeni homogenom izlučenom tvari, koloidom, a obloženi su folikularnim epitelnim stanicama koje u lumen folikula luče tireoglobulin, koji je glavni sastojak koloida (slika 2). Folikularne stanice mogu biti pločaste, kubične ili niske cilindrične. Izgled folikularnog epitela štitnjače ovisi o aktivnosti štitnjače. Ukoliko je štitnjača aktivna prevladavat će folikularne cilindrične stanice, dok će u slučaju smanjene aktivnosti žlijezde, folikuli pretežno biti izgrađeni od pločastih ili kubičnih stanica (2, 7).

Osim folikularnih epitelnih stanica, u štitnjači nalazimo i parafolikularne ili C-stanice koje mogu biti uključene u folikularni epitel ili se mogu nalaziti u intersticiju (slika 2). Ove stanice su nešto veće i svjetlije od folikularnih stanica, a izlučuju kalcitonin, hormon koji sudjeluje u regulaciji krvne koncentracije kalcija (7).



**Slika 2.** Patohistološka građa štitnjače.

Preuzeto s [http://medcell.med.yale.edu/histology/endocrine\\_systems\\_lab/images/](http://medcell.med.yale.edu/histology/endocrine_systems_lab/images/) i prilagođeno.

### 1.1.3. Fiziologija štitnjače

Najvažnija funkcija štitnjače jest lučenje dvaju hormona, trijodtironina ( $T_3$ ) i tiroksina ( $T_4$ ). Oba hormona pohranjena su u koloidu, vezani na tireoglobulin, veliki glikoprotein relativne molekularne mase oko 330 kDa (8). Na tireoglobulinu odvija se i proces sinteze hormona

štitnjače. Jedna molekula tireoglobulina sadrži oko 70 aminokiselina tirozina koje vezanjem s oksidiranim jodom stvaraju hormone štitnjače (2). Proces sinteze i pohrane hormona štitnjače detaljnije je opisan u sljedećem paragrafu.

Najprije se tireoglobulin sintetizira u folikularnim stanicama te se zatim izlučuje u lumen folikula. Sinteza tireoglobulina započinje u hrapavoj endoplazmatskoj mrežici, zatim se u endoplazmatskoj mrežici i Golgijevom kompleksu dodaju ugljikohidrati te se u konačnici iz sekretnih mjehurića tireoglobulin izlučuje u lumen folikula (7). Drugi važan stupanj u stvaranju hormona štitnjače jest prijenos jodida iz krvi u folikularne stanice. Ovaj prijenos se odvija djelovanjem sunosača (engl. *symporter*) natrija i jodida koji kroz bazalnu membranu u unutrašnjost stanice prenosi dva iona natrija i jedan jodidni ion. S obzirom da se u folikularnim stanicama nalazi više joda nego u krvi, energija za prijenos jodida protiv koncentracijskog gradijenta dolazi iz natrijsko-kalijske ATPazne crpke koja izbacuje natrij iz stanice. Time se postiže niska koncentracija natrija unutar stanice, čime se omogućava olakšani transport natrija u stanicu, a samim time i jodida. Jodidi se zatim iz folikularnih stanica kroz apikalnu membranu prenose u lumen folikula s pomoću ionskog nosača zvanog pendrin. Na apikalnoj membrani nalazi se enzim peroksidaza koji uz vodikov peroksid pospješuje oksidaciju jodida, a oksidirani jod se potom može vezati s aminokiselinom tirozinom na molekuli tireoglobulina. Na mjestu gdje koloid dodiruje apikalnu membranu folikularne stanice, dolazi do organifikacije tireoglobulina, odnosno do vezanja oksidiranog joda na tirozinske ostatke na molekuli tireoglobulina. Posredstvom peroksidaze, proces jodiranja tirozinskih ostataka se ubrzava i traje samo nekoliko sekundi ili minuta. Jodiranjem tirozina nastaju molekule monojodtirozina (MIT), a potom i dijodtirozina (DIT), koje se ubrzo počinju međusobno povezivati. U konačnici, spajanjem dviju molekula DIT nastaje jedna molekula  $T_4$ , a spajanjem jedne molekule MIT i jedne molekule DIT nastaje jedna molekula  $T_3$ . Sintetizirani hormoni štitnjače ostaju pohranjeni u folikulima na molekulama tireoglobulina, a pohranjene zalihe hormona dovoljne su za normalnu opskrbu tijela hormonima u sljedeća dva do tri mjeseca (2, 7).

Hormoni štitnjače ostaju vezani za molekule tireoglobulina u folikulima sve dok se za posebne receptore na bazalnoj membrani folikularnih stanica ne veže tireotropin (engl. *thyroid stimulating hormone*, TSH), hormon adenohipofize koji potiče lučenje hormona iz štitnjače. Tada folikularne stanice reagiraju na poticaj TSH-om te pinocitozom unose dijelove

koloida u stanicu. U staničnoj citoplazmi se pinocitozni mjehurići stapaju s lizosomima, te se djelovanjem enzima proteaza, koje su sastavni dio lizosoma, s molekula tireoglobulina oslobađaju u citoplazmu  $T_3$ ,  $T_4$ , MIT i DIT. Slobodni  $T_3$  i  $T_4$  potom prolaze kroz staničnu membranu folikularne stanice i otpuštaju u kapilare. S druge strane, MIT i DIT se ne otpuštaju u krv, već se djelovanjem enzima dejodaze s njihovih molekula uklanja jod. Uklonjeni jod i dejodirani tirozin se stoga mogu ponovno iskoristiti u folikularnim stanicama u novom ciklusu proizvodnje hormona štitnjače (2, 7).

$T_4$  čini otprilike 93%, a  $T_3$  7% od ukupne količine hormona štitnjače otpuštenih u krv. Međutim, djelovanje  $T_3$  je otprilike četiri puta jače i brže od  $T_4$  (1). Dodatno, oko 50% molekula  $T_4$  se u krvi dejodira pa nastanu nove molekule  $T_3$ , stoga u ciljna tkiva  $T_3$  dopijeva u većim količinama (2). S obzirom da su hormoni štitnjače hidrofobne molekule, u plazmi se većinom vežu za proteinske nosače i na taj način dopijevaju do ciljnih tkiva. Slobodna frakcija hormona štitnjače je izrazito mala, 0.03% za  $T_4$  i 0.3% za  $T_3$ . Glavni proteinski nosač za kojeg se veže većina hormona štitnjače jest globulin koji veže tiroksin (eng. *thyroxin binding globulin*, TBG). Hormoni štitnjače se u manjoj mjeri vežu i za transtiretin (TTR, prealbumin koji veže tiroksin) te albumin (5). Hormoni štitnjače izrazito se sporo otpuštaju s proteinskih nosača u ciljne stanice, posebice  $T_4$ , zbog čega je njegov učinak sporiji od  $T_3$ . Poluvrijeme života u krvi  $T_4$  je sedam dana, a  $T_3$  jedan dan. Kada uđu u željene stanice, hormoni se vežu za unutarstanične proteine, pri čemu se  $T_4$  veže jače od  $T_3$ . Na taj način se hormoni pohranjuju u željenim stanicama i polako iskorištavaju u narednom periodu. I u ciljnim stanicama dolazi do dejodiranja većine molekula  $T_4$ , stoga se naposljetku gotovo sav  $T_4$  pretvori u  $T_3$  (2).

Hormoni štitnjače potiču transkripciju mnogih gena u jezgri gotovo svih stanica u tijelu, a novostvoreni proteini na brojne načine utječu na organizam. Općenito, povećava se stanična metabolička aktivnost u cijelom tijelu. Pretjerano lučenje hormona štitnjače može povećati intenzitet bazalnog metabolizma od 60% do čak 100% iznad normalne vrijednosti. Hormoni štitnjače povoljno utječu na metabolizam ugljikohidrata ubrzanjem apsorpcije glukoze i povećavanjem glikolize i glukoneogeneze. Povećano lučenje hormona štitnjače uzrokuje i smanjenje koncentracije kolesterola, fosfolipida i triglicerida u plazmi te povećanje koncentracije slobodnih masnih kiselina. Hormoni štitnjače također potiču i rast u djece, te razvoj mozga u fetalnom razdoblju i u prvim godinama života. Povećana koncentracija

hormona štitnjače može utjecati na smanjenje tjelesne mase, ali isto tako i na povećanje apetita, kao i na povećano lučenje probavnih sokova. Hormoni štitnjače povećavaju prokrvljenost većine tkiva u tijelu, posebice kože, a povećavaju i srčani minutni volumen te srčanu kontraktibilnost. Također, djeluju i na živčani sustav, pri čemu pretjerano lučenje hormona može uzrokovati anksioznost i nervozu, dok nedovoljno lučenje hormona može usporiti mentalne funkcije (2, 9).

Lučenje hormona štitnjače kontrolirano je izlučivanjem TSH iz adenohipofize mehanizmom povratne sprege. TSH povećava lučenje  $T_3$  i  $T_4$  iz štitnjače na način da pospješuje proteolizu tireoglobulina u folikularnim stanicama, povećava prijenos jodida iz krvi u folikularne stanice, povećava organifikaciju tireoglobulina te povećava broj folikularnih stanica, njihov volumen i njihovu sekrecijsku djelatnost. Ukoliko je koncentracija  $T_3$  i  $T_4$  u tjelesnim tekućinama povećana tada se smanjuje izlučivanje TSH iz adenohipofize, a samim time se smanjuje i lučenje  $T_3$  i  $T_4$  iz štitnjače. Na ovaj način se omogućava održavanje optimalne koncentracije hormona štitnjače u tjelesnim tekućinama potrebne za normalnu metaboličku aktivnost u tijelu. Lučenje TSH je pod nadzorom tireoliberina (hormon koji oslobađa tireotropin, TRH), hormona kojeg luči hipotalamus. TRH se hipotalamično-hipofiznim krvnim žilama prenosi do hipofize gdje se veže za specifične TRH receptore na membrani hipofiznih stanica, što naposljetku dovodi do lučenja TSH iz hipofiznih stanica. Ukoliko se prekine veza između adenohipofize i hipotalamusa, lučenje TSH će se znatno smanjiti, ali ipak neće prestati (2, 10).

#### **1.1.4. Bolesti štitnjače**

Održavanje optimalne koncentracije hormona štitnjače ključno je za normalno funkcioniranje cijelog organizma. Ukoliko štitnjača luči previše ili premalo hormona, dolazi do patološkog stanja, pa tako razlikujemo hipertireozu i hipotireozu.

##### **HIPERTIREOZA**

Hipertireoza označava stanje povećanog stvaranja i izlučivanja hormona štitnjače. Patofiziološke promjene u mnogim organskim sustavima uslijed povećanog lučenja hormona štitnjače uzrokuju pojavu niza različitih simptoma bolesti od kojih su najčešći nervoza,



pojačano znojenje, palpitacije, nepodnošenje topline, dispneja u naporu, umor i osjećaj slabosti, topla i vlažna koža (dlanovi), tahikardija, gubitak tjelesne težine, povećan apetit, učestalije stolice i tremor ruku (2, 11).

Najčešći uzrok hipertireoze jest Gravesova ili Basedowljeva bolest. U područjima s dostatnim unosom joda, otprilike 80% bolesnika s hipertireozom ima Gravesovu bolest (12, 13). Gravesova bolest je učestala autoimuna bolest štitnjače uzrokovana kombinacijom genetskih i okolišnih čimbenika. Glavna značajka Gravesove bolesti je stvaranje stimulirajućih protutijela protiv TSH receptora (engl. *thyroid stimulating antibodies*, TSAt). Navedena protutijela se vežu za iste receptore na bazalnoj membrani folikularnih stanica za koje se veže i TSH, te na taj način potiču folikularne stanice na dodatno lučenje hormona štitnjače, što dovodi do hipertireoze (2, 14).

Hipertireoza se u nekim slučajevima može pojaviti i u drugoj izrazito učestaloj autoimunoj bolesti štitnjače s izraženom genetskom podlogom, Hashimotovom tireoiditisu. Iako je ova bolest u većini slučajeva praćena hipotireozom, ponekad se u početku bolesti može pojaviti i prolazna hipertireoza koja najčešće postupno evoluiru u hipotireozu (11, 14, 15).

Hipertireoza može nastati i uslijed toksičnog adenoma ili multinodozne toksične guše, pogotovo u područjima jodne insuficijencije, gdje je u 50% slučajeva uzrok hipertireoze jedna od dvije navedene bolesti (12, 13). Toksični adenom je dobroćudni tumor štitnjače koji sintetizira i luči velike količine hormona štitnjače i ne ovisi o izlučivanju TSH. Slična bolest je i multinodozna toksična guša u kojoj čvorovi štitnjače postaju autonomni i luče hormone štitnjače neovisno o TSH. Obje bolesti se kao uzrok hipertireoze pojavljuju u starijih osoba (11, 16).

## HIPOTIREOZA

Hipotireoza predstavlja stanje smanjene sinteze i lučenja hormona štitnjače. S obzirom da su patofiziološki procesi u hipotireozu suprotni onima u hipertireozu, tako se i sami simptomi bolesti uglavnom razlikuju. U najčešće simptome hipotireoze ubrajaju se slabost, suha i hrapava koža, usporen govor, otečenost očnih kapaka, osjetljivost na hladnoću, hladna koža, edem lica, lomljivost kose, blijeda koža, poremećaj pamćenja, konstipacija, porast tjelesne težine, gubitak dlaka, dispneja, periferni edemi i promuklost (2, 11).

Klinički manifestna hipotireoza definira se kao stanje povišene koncentracije TSH i snižene koncentracije  $T_4$  ( $fT_4$ ). Predstadijem manifestne hipotireoze smatra se supklinička hipotireoza koja označava stanje u kojem su vrijednosti TSH povišene, a vrijednosti  $T_4$  ( $fT_4$ ) uredne. Godišnje čak 5% do 20% slučajeva prelazi iz supkliničke u manifestnu hipotireozu (11). Procjenjuje se da prevalencija supkliničke hipotireoze iznosi od 4% do 20%, dok prevalencija manifestne hipotireoze varira od 0.3% do 3.7% u SAD-u i od 0.2% do 5.3% u Europi (17, 18). Također, nedavna meta-analiza studija provedenih u devet europskih zemalja pokazala je da prevalencija nedijagnosticirane hipotireoze iznosi čak 5% (19).

Ovisno o uzroku, hipotireoza se može podijeliti na primarnu, sekundarnu i tercijarnu. Primarna hipotireoza je posljedica bolesti štitnjače ili poremećaja funkcije štitnjače, sekundarna se pojavljuje rijetko, a uzrokovana je izostankom stimulacije zdrave štitnjače uslijed poremećaja u hipofizi ili hipotalamusu, dok je tercijarna hipotireoza, koja je izrazito rijetka, uzrokovana mutacijom gena za receptore za hormone štitnjače (11).

Nedovoljan unos joda onemogućava proizvodnju hormona štitnjače te stoga može uzrokovati hipotireozu. Najozbiljnije posljedice nedovoljnog unosa joda su gušavost te razvoj kretenizma čija su glavna obilježja zaostajanje u tjelesnom rastu i mentalna retardacija. Javno-zdravstveni programi jodiranja soli, koji su se u nekim zemljama počeli provoditi već početkom 20. stoljeća i koje je do danas usvojila i razvila većina zemalja, predstavljaju najjeftiniji i najsigurniji način prevencije razvoja bolesti uzrokovanih nedostatkom joda te kognitivnih i tjelesnih oštećenja (18, 20). Unatoč naporima, jodna insuficijencija je i danas prisutna u velikim dijelovima Afrike i Azije, ali i u određenim sub-populacijama (najčešće trudnicama) nekih visoko razvijenih zemalja (18, 21, 22). Endemska gušavost i endemski kretenizam predstavljali su važan javno-zdravstveni problem i u nekim dijelovima Hrvatske u 20. stoljeću. Međutim, uvođenjem zakona o obvezatnom jodiranju soli sa 10 mg KJ/kg soli 1953. godine, i uvođenjem novog zakona o povećanju jodiranja soli na 25 mg KJ/kg soli 1996. godine, u Hrvatskoj su ove bolesti iskorijenjene te je 2003. godine postignuta jodna suficijencija (23).

Najčešći uzrok hipotireoze u područjima s dostatnim unosom joda je Hashimotov tireoiditis. Bolesnici s Hashimotovim tireoiditisom su većinom u početku bolesti eutireoidni ili imaju supkliničku hipotireozu, no autoimuna upala razara tkivo štitnjače koje s vremenom propada

i naposljetku fibrozira. Zbog toga se lučenje hormona štitnjače smanji ili u potpunosti prestane, odnosno dolazi do hipotireoze (11, 15). S obzirom da je tema ove disertacije upravo Hashimotov tireoiditis, detaljan opis ove bolesti dan je u zasebnom poglavlju.

Čest uzrok hipotireoze je i primjena radioaktivnog joda u liječenju hipertireoze, odnosno Gravesove bolesti. Nedugo nakon liječenja može doći do supkliničke hipotireoze koja se postepeno pogoršava i prelazi u manifestnu bolest. Učestalost hipotireoze 5 godina nakon liječenja iznosi od 7% do 50%. Dugoročno, otprilike 80% bolesnika s Gravesovom bolesti liječenih radioaktivnim jodom razvija hipotireozu, čak i pri niskim dozama. Nešto rjeđe, hipotireoza može nastati i kao posljedica primjene radioaktivnog joda u liječenju toksičnog adenoma ili multinodozne toksične guše. Također, hipotireoza se može razviti i nakon vanjskog zračenja malignih bolesti vrata ili nakon kirurškog liječenja štitnjače. Primjena lijekova koji sadržavaju jod, poput amiodarona, također može uzrokovati hipotireozu zbog preopterećenja jodom čime se trenutno smanjuje aktivnost štitnjače i sinteza hormona štitnjače. Sličan učinak ima i litij koji se koristi u liječenju nekih psihijatrijskih bolesti (11, 18).

## **1.2. Hashimotov tireoiditis (HT)**

Hashimotov tireoiditis (HT), poznat i pod nazivom kronični limfocitni tireoiditis ili kronični autoimunosni tireoiditis, najučestalija je autoimuna bolest štitnjače. Bolest ima izraženu genetsku podlogu i uzrokovana je kombinacijom genetske predispozicije i različitih okolišnih čimbenika (14). Osnovna značajka HT-a jest infiltracija limfocita u štitnjaču i razaranje tkiva štitnjače, što postupno može dovesti do hipotireoze (15, 24, 25). HT je prvi put opisan kao posebno patološko stanje prije više od stotinu godina. Bolest je 1912. godine opisao japanski kirurg dr. Hakaru Hashimoto u četiri bolesnika s kroničnom limfocitičkom upalom štitnjače i atrofijom tkiva štinjače i nazvao je limfomatozna struma (14, 26).

### **1.2.1. Epidemiologija HT-a**

Autoimune bolesti štitnjače imaju najveću incidenciju među svim autoimunim bolestima povezanim s određenim organom te predstavljaju važan javno-zdravstveni problem (27).

Procjenjuje se da prevalencija autoimunih bolesti štitnjače u općoj populaciji iznosi od 5% do 10% (28). Hashimotov tireoiditis (HT) je najučestaliji oblik autoimune bolesti štitnjače, štoviše, HT se ubraja među najrasprostranjenije endokrinološke poremećaje današnjice i najučestalije autoimune bolesti općenito (29). Kao što je ranije spomenuto, HT se smatra i najčešćim uzrokom hipotireoze u područjima s dostatnim unosom joda. Rizik od razvoja HT-a povećava se s godinama, međutim bolest se može pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi, uključujući i djetinjstvo (14). Također, bolest se i do 10 puta češće pojavljuje u žena nego u muškaraca (30). Prema sustavnom pregledu literature provedenom 2008. godine, procijenjena godišnja incidencija HT-a iznosi 350/100 000 osoba za žene, odnosno 80/100 000 osoba za muškarce (31). U bolesnika s HT-om učestala je prisutnost i drugih autoimunih bolesti, ponajviše reumatoidnog artritisa, kroničnog autoimunog gastritisa i vitiliga, no relativno često se pojavljuju i reumatska polimialgija, celijakija, šećerna bolest tipa 1, Sjogrenov sindrom, multipla skleroza, sustavni eritemski lupus i sarkoidoza (32).

### **1.2.2. Etiopatogeneza HT-a**

Glavna značajka HT-a jest infiltracija limfocita T i B u štitnjaču. Unatoč velikom broju provedenih istraživanja, točan mehanizam autoimunog procesa u HT-u nije još u potpunosti razjašnjen. Predloženi mehanizmi uključuju smanjenje broja i oštećenje regulatornih limfocita T (engl. *T regulatory cells*, Tregs) te povećanu aktivnost folikularnih pomagačkih limfocita T (engl. *follicular helper T cells*, T<sub>fh</sub>), što naposljetku omogućuje limfocitima B stvaranje protutijela protiv vlastitih antigena štitnjače. U stvaranju kliničke slike limfociti T sudjeluju i uništavanjem folikularnih stanica izravnim citoskičnim djelovanjem. Osim toga, limfociti T utječu i neizravno na funkciju i vitalnost folikularnih stanica, putem proizvodnje citokina koji mijenjaju integritet te metaboličku i imunsku funkciju folikularnih stanica (14, 33, 34).

Još jedno važno obilježje HT-a jest prisutnost protutijela protiv dva glavna antigena štitnjače – tireoglobulina (Tg) i štitne peroksidaze (TPO) (25). Iako su tireoglobulin i štitna peroksidaza različiti antigeni, protutijela protiv tireoglobulina (TgAt) i štitne peroksidaze (TPOAt) imaju mnoga zajednička obilježja. Oba protutijela su uglavnom imunoglobulini razreda G (IgG) te imaju visok afinitet prema vlastitim antigenima (35). TPOAt su prisutni u otprilike 90%, a

TgAt u otprilike 80% bolesnika s HT-om (35, 36). Oba protutijela štitnjače služe kao ključni klinički markeri pri postavljanju dijagnoze HT-a, međutim smatra se da su TPOAt najbolji prediktori autoimunog poremećaja štitnjače (15). Iako protutijela štitnjače upućuju na oštećenje tkiva štitnjače, smatra se da ova protutijela nisu uzročni čimbenici bolesti i da najvjerojatnije nemaju ključnu ulogu u patogenezi HT-a (36, 37). Ipak, poznato je da TPOAt mogu fiksirati komplement i na taj način oštetiti folikularne stanice putem mehanizma stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (35, 38). Međutim, pretpostavlja se da je ukupno oštećenje tkiva štitnjače izazvano TPOAt-ima neusporedivo manje u odnosu na ukupno oštećenje štitnjače koje izazovu limfociti T izravnim citotoksičnim djelovanjem ili neposredno lučenjem citokina (36). S druge strane, TgAt ne posjeduju mogućnost fiksiranja komplementa te stoga ne uzrokuju oštećenje štitnjače, ali, poput TPOAt-a, služe kao važan marker poremećene funkcije štitnjače (25, 33).

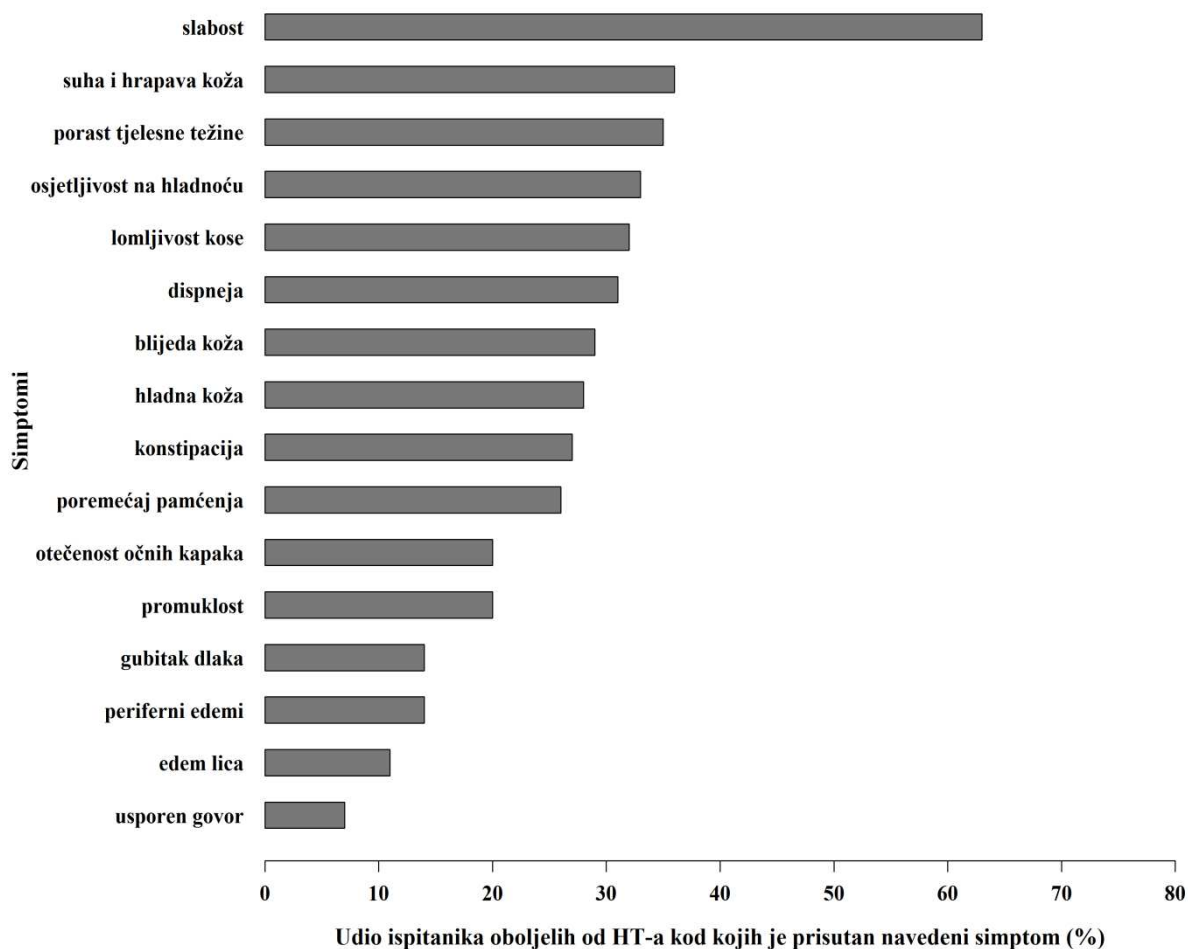
HT je uzrokovan složenim međudjelovanjem genetskih i okolišnih čimbenika, od čega se otprilike 75% razvoja HT-a pripisuje genetskim čimbenicima, a 25% okolišnim čimbenicima (39). Dosad je otkriveno više različitih okolišnih čimbenika koji mogu doprinijeti razvoju HT-a. Naj snažniji dokazi povezanosti s HT-om pronađeni su za povećan unos joda kroz sol. Provedeno je više različitih longitudinalnih i presječnih studija koje su pokazale da je jodiranje soli, koje je provedeno u mnogim zemljama, značajno povećalo prevalenciju i incidenciju HT-a i autoimunosti štitnjače (40-43). Prolazno ili trajno oštećenje funkcije štitnjače, uključujući i HT, mogu uzrokovati i citokini, poput interferona- $\alpha$ , koji se sve češće primjenjuju u liječenju različitih vrsta karcinoma. Neke studije sugeriraju da razvoju HT-a može pogodovati i nedovoljan unos selena te nedostatak vitamina D, međutim ove povezanosti treba još dodatno ispitati (34). Osim toga, nastanku HT-a mogu doprinijeti i infekcije uzrokovane virusima poput hepatitis C virusa, Epstein-Barr virusa ili humanog herpes virusa 6 (HHV-6), kao i infekcije uzrokovane bakterijama poput *Yersinia enterocolitice*. Svejedno, navedene povezanosti nisu još u potpunosti potvrđene te ih je potrebno dodatno istražiti (34, 44, 45).

S obzirom da je otkrivanje genetskih čimbenika uključenih u razvoj HT-a tema ove disertacije, genetska pozadina bolesti detaljno je opisana u zasebnom poglavlju.

### 1.2.3. Klinička slika HT-a

Bolesnici liječniku najčešće dolaze zbog guše tvrdo-elastične, gumene konzistencije. Često je u štitnjači prisutan i naglašeni piramidalni režanj. Uvećanje štitnjače često se otkrije slučajno, prilikom sistematskog pregleda, i u većini slučajeva je bezbolno, a bolesnici eventualno navode punoću ždrijela ili blaži pritisak u vratu. U nekim slučajevima štitnjača može biti bolna. Neki bolesnici u početku mogu imati kliničke znakove hipotireoze, a kod njih štitnjača može biti mala, atrofična i fibrozno promijenjena. Većina bolesnika u početku bolesti je eutireoidna ili u supkliničkoj hipotireozu. Međutim, autoimuna upala postupno razara tkivo štitnjače, što s vremenom može dovesti do atrofije štitnjače i razvoja hipotireoze. Među bolesnicima s HT-om koji imaju supkliničku hipotireozu, manifestna hipotireoza godišnje se razvije u 4% slučajeva (46). S druge strane, neki bolesnici u početku bolesti mogu razviti hipertireozu čiji je uzrok, kao i u Gravesovoj bolesti, stvaranje stimulirajućih protutijela protiv TSH receptora. Ovo stanje je prolazno i naziva se tireotoksikoza ili hashitoksikoza, a nakon određenog vremena uspostavi se uredna funkcija štitnjače ili se razvije hipotireoza (11, 14).

S obzirom da većina bolesnika s HT-om postupno razvije supkliničku ili manifestnu hipotireozu, tako su i simptomi u HT-u slični onima u hipotireozu. Naša znanstvena grupa nedavno je provela presječno istraživanje u koje je bilo uključeno 290 ispitanika oboljelih od HT-a s ciljem detaljne fenotipske karakterizacije bolesnika. Istraživanje je pokazalo da se, od 16 poznatih simptoma hipotireoze, u bolesnika s HT-om najčešće pojavljuju slabost, suha i hrapava koža te porast tjelesne težine, a najrjeđe usporen govor (slika 3). Također, zanimljivo je i da je otkrivena značajna povezanost između TgAt i broja simptoma, što upućuje na važnu ulogu autoimunog procesa u kliničkoj manifestaciji bolesti. Utvrđena je i značajna povezanost između TgAt i lomljivosti kose, edema lica, otečenosti očnih kapaka i promuklosti, što ukazuje na mogućnost da navedeni simptomi nisu posljedica hipotireoze, već upravo autoimunog procesa koji se odvija u štitnjači (47).



**Slika 3.** Učestalost simptoma kod bolesnika s HT-om.

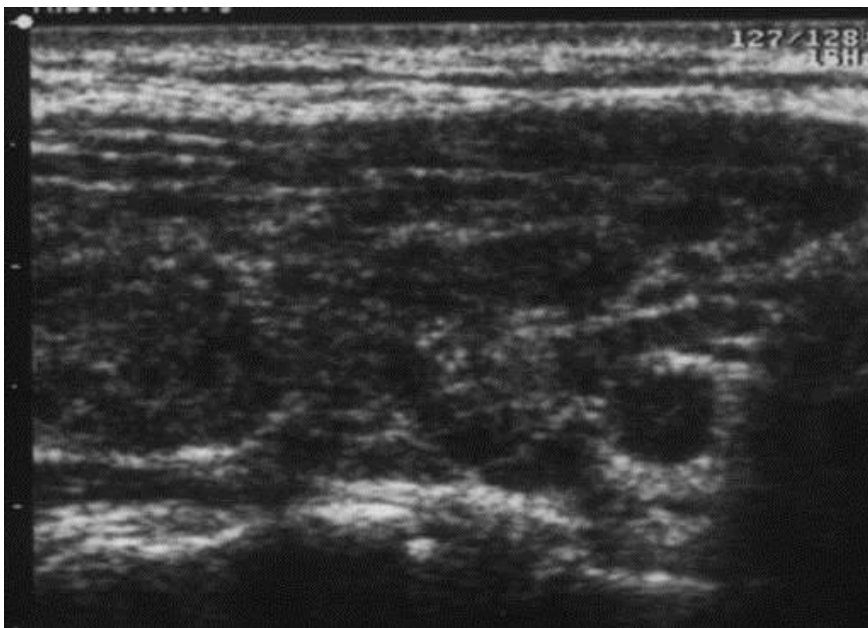
Preuzeto i prilagođeno prema (47).

#### 1.2.4. Dijagnoza HT-a

Pri kliničkom pregledu može se posumnjati na HT ukoliko se otkrije glatka ili čvorasta guša, čvrsto-elastične, gumaste konzistencije, za razliku od konzistencije normalne štitnjače. S obzirom da većina bolesnika ima supkliničku hipotireozu, za postavljanje dijagnoze potrebno je odrediti koncentraciju TSH u serumu, a potom i koncentraciju  $T_4$  ( $fT_4$ ). U početnoj fazi bolesti TSH je najčešće blago povišen, a  $T_4$  ( $fT_4$ ) u referentnim granicama ili blago snižen. Progrijom bolesti koncentracija TSH raste, dok se koncentracija  $T_4$  ( $fT_4$ ) snižava, stoga je potrebno redovito kontrolirati stanje bolesti mjerenjem koncentracija navedenih hormona i u skladu s laboratorijskim nalazima prilagođavati terapiju. Za potvrdu dijagnoze svakako je

potrebno odrediti krvne koncentracije protutijela štitnjače (TPOAt i TgAt). TPOAt i TgAt su pozitivna u većini bolesnika, a njihova koncentracija korelira s limfocitičkom infiltracijom štitnjače, te stoga služe kao ključan dijagnostički marker (11, 14, 48, 49).

Pouzdana, neinvazivna metoda za dijagnozu HT-a jest i ultrazvučni pregled štitnjače, koji u slučaju HT-a pokazuje karakterističan nalaz (48). Ovisno o fazi bolesti, štitnjača može biti smanjena, normalne veličine ili povećana, a tkivo štitnjače je nehomogeno i često hipoehogeno zbog masivne limfocitičke infiltracije, a moguća je i pojava hiperehogenih tračaka, zbog fibroze (slika 4) (14, 50-52). U ranoj fazi bolesti moguće je da TPOAt i TgAt budu negativna, te se tada karakteristična ultrazvučna slika štitnjače smatra ranim dokazom bolesti (50).



**Slika 4.** Karakteristični ultrazvučni nalaz štitnjače u bolesnika s HT-om.

Ustupila Ana Barić, dr. med. (Klinički zavod za nuklearnu medicinu KBC Split)

#### **1.2.5. Liječenje HT-a**

U određenom dijelu bolesnika s HT-om, iako je prisutna kronična upala štitnjače, funkcija žlijezde je normalna, guša je mala, a simptomi bolesti nisu prisutni. Opisano eutireoidno



stanje može trajati godinama, te u tom slučaju nije potrebno liječenje, no potrebna je redovita kontrola koncentracija TSH i  $fT_4$  u serumu. Ukoliko dođe do razvoja hipotireoze, potrebno je liječenje nadomjesnom hormonskom terapijom. Postoje različiti preparati hormona štitnjače, međutim u standardnom liječenju danas se najčešće koristi levotiroksin ( $LT_4$ ), sintetski analog hormona  $T_4$ . Terapijska doza se treba individualno prilagoditi sukladno kliničkoj slici bolesnika i koncentracijama TSH i  $fT_4$  u serumu. Cilj nadomjesne terapije je postizanje eutireoidnog stanja i potpune kliničke remisije. U supkliničkoj hipotireozu, odluka o liječenju ovisi o dobi, koncentraciji TSH i TPOAt te kliničkoj slici bolesnika. Kod bolesnika koji su razvili tireotoksikozu, liječenje se najčešće ne provodi jer je hipertireoza prolazna i funkcija štitnjače se spontano normalizira, a često evoluira i u hipotireozu koja se onda liječi na već opisan način (11, 14).

### 1.3. Genetske studije povezanosti

Mnoge složene bolesti, uključujući i HT, uzrokovane su različitim genetskim i okolišnim čimbenicima. Takve bolesti nisu uvjetovane jednim genom, već u njihovom nastanku najčešće sudjeluje mnogo različitih gena od kojih neki geni doprinose razvoju bolesti u manjoj, a neki u većoj mjeri. Ukoliko se želi utvrditi povezanost nekog gena s bolešću, u genetici se najčešće koriste studije povezanosti (engl. *association studies*). Genetske studije povezanosti provode se na način da se uspoređuje frekvencija odabrane genetske varijante između skupine oboljelih i kontrolne skupine. Ukoliko se frekvencije između skupina značajno razlikuju tada se tvrdi da je odabrana varijanta povezana s bolešću. Ovakav tip studije još se naziva i istraživanje parova (engl. *case-control study*). Pri provođenju ovakvih studija u obzir treba uzeti i populacijsku stratifikaciju, koja se događa kada se slučajevi i kontrole slučajno odaberu iz podskupina različitog podrijetla, pa se može dogoditi da je bolest, ali i promatrana varijanta, učestalija u jednoj od skupina, što u konačnici može dovesti do lažno pozitivnog rezultata. Stoga je pri provođenju studija povezanosti nužan oprezan odabir ispitanika koji se uključuju u studiju s ciljem minimiziranja populacijske stratifikacije (53).

Bitno je napomenuti da se u genetskim studijama povezanosti mogu istraživati različite vrste genetskih varijanti, poput insercija, delecija, translokacija itd., međutim najčešće se istražuju

polimorfizmi jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP), ili skraćeno polimorfizmi. Ovisno o načinu odabira polimorfizama čija će se povezanost s bolešću testirati, razlikujemo dvije vrste genetskih studija povezanosti: kandidatne genetske studije povezanosti (engl. *candidate gene association studies*) i cjelogenomske studije povezanosti (engl. *genome-wide association studies*, GWAS) (53).

### **1.3.1. Kandidatne genetske studije povezanosti**

Kandidatne genetske studije povezanosti provode se na način da se najprije odabere neki kandidatni gen ili genomska regija koja bi na osnovu nekog valjanog biološkog razloga mogla biti povezana s bolešću. Zatim se unutar odabranog gena ili regije najčešće odabiru funkcionalni polimorfizmi, genotipiziraju se te se potom testira njihova povezanost s bolešću. Funkcionalni polimorfizmi su oni polimorfizmi koji na neki način utječu na funkcionalnost bjelančevina koje kodira gen od interesa. Osim funkcionalnih polimorfizama, zanimljivi su i ostali polimorfizmi unutar promatranog gena ili regije, jer se isti mogu nalaziti u neravnoteži vezanosti (engl. *linkage disequilibrium*, LD) s uzročnim polimorfizmom (engl. *causal variant*) koji zaista sudjeluje u razvoju bolesti. U tom slučaju su takvi polimorfizmi markeri uzročnog polimorfizma, jer se nasljeđuju zajedno s uzročnim polimorfizmom češće nego bi se to očekivalo slučajnim nasljeđivanjem (53-55).

Dosad je objavljeno mnogo kandidatnih genetskih studija koje su otkrile povezanost različitih kandidatnih gena sa širokim spektrom bolesti. Međutim, u mnogim slučajevima otkrivene povezanosti nisu bile potvrđene u neovisnim studijama, najvećim dijelom zbog malih veličina uzoraka na kojima su originalne studije bile provedene. Osim toga, uzrok dobivenih lažno pozitivnih rezultata može biti i niska prvotna vjerojatnost da su odabrane varijante povezane s bolešću, kao i činjenica da se u određenom dijelu studija nije u obzir uzela populacijska stratifikacija (53).

### **1.3.2. Cjelogenomske studije povezanosti**

Odmak od kandidatnih genetskih studija prema cjelogenomskim studijama povezanosti omogućen je tek u novije vrijeme razvojem brzih i relativno jeftinih načina genotipiziranja

stotina tisuća polimorfizama, kao i stvaranjem javno dostupnih referentnih kataloga polimorfizama i haplotipova – projekta „HapMap“ (engl. *International Haplotype Map*) i projekta „1000 genoma“ (engl. *1000 Genomes*). Cjelogenomske studije povezanosti trenutno predstavljaju jednu od najučinkovitijih metoda za istraživanje genetske predispozicije složenih bolesti, a provode se od 2006. godine (53). Za razliku od kandidatnih genetskih studija, gdje se odabiru kandidatne genetske varijante i potom testira njihova povezanost s određenom bolesti, cjelogenomske studije se temelje na pretpostavci da sve genomske regije mogu imati jednak utjecaj na nastanak bolesti (56). Stoga se u cjelogenomskim studijama obično genotipizira nekoliko stotina tisuća do nekoliko milijuna polimorfizama. Stvaranjem javno dostupnih referentnih panela, poput „1000 genoma“, te razvojem složenih matematičkih modela zasnovanih na skrivenim Markovljevim modelima, omogućena je i imputacija genotipova za polimorfizme koji nisu direktno genotipizirani. Na ovaj način se u cjelogenomskim studijama dodatno može povećati broj polimorfizama čija se povezanost s bolešću testira (57). Također, za razliku od kandidatnih studija, problem populacijske stratifikacije se u cjelogenomskim studijama puno lakše premošćuje, uporabom regresijskih modela koji uspješno eliminiraju utjecaj populacijske stratifikacije procjenom razine srodstva između svih parova ispitanika. Razina srodstva se procjenjuje usporedbom genotipova svih genotipiziranih polimorfizama, što u kandidatnim studijama nije bilo moguće zbog malog broja genotipiziranih polimorfizama. Općenito, cjelogenomske studije povezanosti znatno su ubrzale otkrivanje novih varijanti u polju humane genetike, uz izrazito visok udio varijanti repliciranih u nezavisnim studijama (58).

#### **1.4. Genetska pozadina HT-a**

HT ima izrazito snažnu genetsku predispoziciju koja u kombinaciji s različitim okolišnim čimbenicima dovodi do nastanka bolesti. Iako je broj studija koje pokušavaju istražiti genetsku pozadinu ove bolesti u konstantnom porastu, genetske odrednice koje doprinose razvoju HT-a slabo su istražene. Unatoč činjenici da je otprilike 75% predispozicije za nastanak HT-a uvjetovano genetskim čimbenicima, nedavno objavljena studija utvrdila je da se samo 5.5% predispozicije za razvoj HT-a može pripisati dosad otkrivenim genetskim čimbenicima (59).

Fokus velikog broja dosad provedenih kandidatnih studija povezanosti na HT-u bio je postavljen na analizu gena unutar *HLA* regije. *HLA* regija općenito je najbolje istražena regija u genomu u kojoj se nalaze mnogi geni koji reguliraju razne imunološke funkcije i uključeni su u nastanak različitih autoimunih bolesti. Pokazano je da *HLA-B\*46:01* povećava rizik od nastanka HT-a u skupini kineske djece (60). Također, studija provedena na uzorku od 444 bolesnika s HT-om iz Japana pokazala je da *HLA-A\*02:07* i *HLA-DRB4* potiču razvoj bolesti, dok haplotip *HLA-A\*33:03-C\*14:03-B\*44:03-DRB1\*13:02-DQB1\*06:04-DPB1\*04:01* ima protektivan učinak na bolest (61). U europskoj populaciji povezanost s HT-om utvrđena je za *HLA-DR3* (*HLA-DRB1\*03*), *HLA-DR4* (*HLA-DRB1\*04*) i *HLA-DQB1* (62-64).

Od ostalih poznatih imunoregulatornih gena, kandidatnim pristupom utvrđeno je da bi *CTLA-4*, *PTPN22* i *CD40* mogli biti uključeni u nastanak autoimunih bolesti štitnjače. Međutim, više informacija o povezanosti navedenih gena s HT-om dale su nedavno provedene meta-analize. Meta-analiza studija koje su istraživale polimorfizam A49G unutar *CTLA-4* gena pokazala je da ovaj polimorfizam povećava rizik od nastanka HT-a i u azijskoj i u bjelačkoj populaciji (65). Ovaj gen glavni je negativni regulator T-stanične imunosti te je povezan i s mnogim drugim autoimunim bolestima (14). Suprotno tome, meta-analiza studija na polimorfizmu C1858T unutar *PTPN22* gena pokazala je da ovaj polimorfizam ipak nije povezan s HT-om, ali doprinosi razvoju Gravesove bolesti (66). Isto je pokazano i za polimorfizam C/T1 unutar *CD40* gena; navedeni polimorfizam je povezan s Gravesovom bolesti, ali ne i s HT-om (67).

Sljedeća skupina gena analiziranih putem kandidatnih studija povezanosti uključivala je gene koji reguliraju ekspresiju različitih citokina. Studija provedena na uzorku od 202 bolesnika s HT-om i 249 kontrola u Tunisu pokazala je povezanost polimorfizma VNTR unutar *IL1RN* gena s HT-om, dok je studija provedena na 182 kineska ispitanika oboljela od HT-a i 224 kontrole pokazala potencijalnu uključenost *IL17F* gena u razvoj HT-a (68, 69). Studija provedena na 115 bolesnika s HT-om i 103 kontrole sugerirala je povezanost *IL1 $\beta$*  gena s HT-om u poljskoj populaciji (70). Usporedbom 58 pacijenata s HT-om koji su razvili hipotireozu i 49 pacijenata s HT-om u eutireozu, studija provedena u Japanu sugerirala je *GITR* kao mogući gen povezan s razvojem hipotireoze u HT-u (71). Istraživanje provedeno na 250 kineskih bolesnika s HT-om i 301 kontrola utvrdilo je povezanost *STAT3* gena s HT-om, ali također i s Gravesovom bolesti (72).

Od gena izravno ili neizravno povezanih s funkcijom štitnjače, dosad je pronađen samo jedan gen uključen u patogenezu HT-a. Istraživanje provedeno u Portugalu, koje je uključilo 481 ispitanika s HT-om i 516 kontrola, utvrdilo je povezanost polimorfizma unutar promotorske regije *SEPS1* gena s HT-om (73). Ova povezanost je i potvrđena u nezavisnoj replikacijskoj studiji provedenoj u Kini na uzorku od 1013 bolesnika s HT-om i 2998 kontrola (74). *SEPS1* gen kodira selenoprotein S koji štiti stanice od oksidativnog stresa i apoptoze, a selen je mikronutrijent potreban za normalno funkcioniranje štitnjače i homeostazu hormona štitnjače. Također, kao što je ranije spomenuto, neke studije sugeriraju da nedovoljan unos selena može utjecati na razvoj HT-a (34, 73).

S obzirom na dosad navedeno, možemo zaključiti da su kandidatne genetske studije dosad otkrile svega nekoliko gena potencijalno uključenih u razvoj HT-a, koji se mogu podijeliti na gene povezane s autoimunim sustavom (*HLA*, *CTLA-4*, *IL1RN*, *IL17F*, *IL1B*, *GITR*, *STAT3*) te funkcijom štitnjače (*SEPS1*). Međutim, značajna ograničenja većine navedenih studija su nedovoljne veličine uzoraka te činjenica da, osim *HLA*, *CTLA-4* i *SEPS1* gena, nijedan rezultat nije potvrđen ili repliciran u nezavisnoj skupini (34).

Iako su cjelogenomske studije povezanosti dosad analizirale više stotina složenih fenotipova i bolesti, samo nekoliko studija je bilo fokusirano na autoimune bolesti štitnjače i to pretežno na Gravesovu bolest. Iako je HT najčešća autoimuna bolest štitnjače te jedan od najučestalijih endokrinoloških i autoimunih poremećaja, do danas nijedna cjelogenomska analiza povezanosti nije bila vezana isključivo za HT (28, 58).

Od svih dosad istraženih bolesti na razini čitavog genoma, najbližnja HT-u je hipotireoza koja je analizirana u tri cjelogenomske studije. Jedna cjelogenomska studija je analizirala bolesnike s hipotireozom uporabom elektronske baze podataka „eMERGE“ (engl. *Electronic Medical Records and Genomics*) koja sadrži cjelogenomske i fenotipske podatke o bolesnicima liječenim u različitim bolničkim centrima diljem SAD-a (75). Druge dvije studije analizirale su ispitanike koji su genotipizirani na razini čitavog genoma u privatnoj tvrtki te su na temelju samoprocjene prijavili da imaju hipotireozu (76, 77). Zajedno su navedene tri studije otkrile više lokusa koji imaju ulogu u razvoju različitih autoimunih bolesti, poput *PTPN22*, *ATXN2* i *HLA* razreda I, ali su također identificirale i neke nove gene, poput *FOXO1* i *VAV3* (75-77). Međutim, treba imati u vidu da je hipotireoza ipak širi pojam od HT-a i da ne

mora nužno biti autoimunog podrijetla, stoga je potreban oprez pri interpretaciji i translaciji ovih rezultata u HT (28).

Jedna studija istražila je genetske odrednice autoimunih bolesti štitnjače usporedbom 9364 ispitanika iz kontrolne skupine s 2258 bolesnika s Gravesovom bolesti i 462 bolesnika s HT-om. Ispitanici uključeni u ovu studiju genotipizirani su uporabom „ImmunoChip“ genotipizacijske platforme koja sadrži pažljivo odabrane genetske varijante u 186 lokusa povezanih s različitim autoimunim bolestima. Studija je otkrila sedam lokusa uključenih u razvoj autoimunih bolesti štitnjače. Međutim, u dodatnoj analizi provedenoj isključivo u kohorti bolesnika s HT-om, nijedan od sedam otkrivenih lokusa nije pokazao snažnu povezanost s HT-om, dok su četiri lokusa pokazala slabu povezanost (78). Bitno je napomenuti da genotipizacijska platforma „ImmunoChip“ nije standardna cjelogenomska platforma koja sadrži polimorfizme raspoređene po čitavom genomu, već sadrži samo mali dio genoma. Dodatno, kombiniranjem ispitanika oboljelih od HT-a i Gravesove bolesti, studija je dizajnirana na način da otkrije zajedničke genetske odrednice HT-a i Gravesove bolesti, a ne posebne genetske čimbenike koji su povezani isključivo s HT-om ili isključivo s Gravesovom bolesti. Nedavno je objavljena i studija koja je pokušala istražiti genetske različitosti između HT-a i Gravesove bolesti u japanskoj populaciji. U istraživanje je uključeno 444 bolesnika s HT-om i 546 bolesnika s Gravesovom bolesti, a dvije skupine su uspoređene na razini čitavog genoma, te je na cjelogenomskoj razini značajnosti otkriven lokus unutar *VAV3* gena. Otkriveni lokus je potom odabran za dodatnu analizu u 444 bolesnika s HT-om i 1363 kontrole, gdje je pokazana povezanost ovog lokusa s HT-om, no ovaj rezultat nije potvrđen u nezavisnoj replikacijskoj skupini (79).

Nedavno su objavljene i dvije cjelogenomske studije koje su istražile zajedničku genetsku pozadinu autoimunih bolesti štitnjače i ostalih autoimunih bolesti. Jedna studija je usporedila 1067 kontrola s 531 ispitanika koji su razvili autoimunu bolest štitnjače zajedno sa šećernom bolesti tipa 1. Otkriveno je više lokusa povezanih sa zajedničkom pojavnošću autoimune bolesti štitnjače i šećerne bolesti tipa 1, uključujući i novi *GPR103* lokus koji ranije nije bio povezivan ni s jednom od dviju bolesti (80). U drugoj studiji provedena je velika meta-analiza deset autoimunih bolesti u 6035 bolesnika s autoimunom bolesti i 10718 kontrola, te je otkriveno pet nezavisnih signala povezanih s autoimunom bolesti štitnjače i

jednom ili više ostalih autoimunih bolesti, uključujući poznati lokus unutar *PTPN22* gena, ali i četiri nova lokusa (*IL21*, *IL2RA*, *SBK1*, *TENM3*) (81).

Imajući u vidu dosad provedena istraživanja, možemo reći da je trenutno znanje o genetskoj pozadini HT-a ograničeno, što sugerira da je provođenje cjelogenomske analize povezanosti HT-a prioritet u ovom znanstvenom polju. Upravo iz tog razloga ustanovili smo kohortu ispitanika oboljelih od HT-a i proveli prvu cjelogenomsku studiju povezanosti fokusiranu isključivo na HT. Također, upotrijebili smo i dvije manje nezavisne kohorte s ciljem replikacije najznačajnijih lokusa. Ovo istraživanje donosi nova, važna znanja u polju genetike HT-a te pokušava rasvijetliti genetske odrednice ove složene bolesti na razini čitavog genoma.

## **2. CILJ RADA I HIPOTEZE**



## Glavni cilj:

1. Usporedbom genotipova 8.6 milijuna genetskih varijanti raspoređenih po čitavom genomu između ispitanika oboljelih od HT-a i kontrola, odrediti nove genetske varijante koje su povezane s razvojem HT-a.

## Sporedni ciljevi:

2. Na temelju otkrivenih genetskih varijanti povezanih s razvojem HT-a, za svakog ispitanika izračunati genetski rizični skor (GRS). Provesti analizu povezanosti između GRS-a i HT-a te odrediti udio varijabilnosti u HT-u objašnjen GRS-om, tj. otkrivenim genetskim varijantama. Usporediti udio ispitanika oboljelih od HT-a između donjeg GRS kvartila i ostalih kvartila.
3. Detaljno evaluirati povezanost između genetskih varijanti unutar *HLA* regije i HT-a.
4. U početnoj skupini ovog istraživanja ispitati povezanost između HT-a i poznatih kandidatnih genetskih varijanti koje su bile povezane s HT-om putem kandidatnih genetskih studija ili s fenotipovima biološki sličnim HT-u putem cjelogenomskih studija.

## Hipoteze:

1. Postoje nove, dosad neotkrivene genetske varijante povezane s razvojem HT-a.
2. Genetski rizični skor (GRS) izračunat na temelju novootkrivenih varijanti statistički je značajan prediktor bolesti.
3. Postoje genetske varijante unutar *HLA* regije koje su povezane s HT-om.
4. Postoje poznate kandidatne genetske varijante (za koje je sugerirano da su povezane s HT-om putem kandidatnih genetskih studija ili s fenotipovima biološki sličnim HT-u putem cjelogenomskih studija) koje su povezane s HT-om u početnoj skupini ovog istraživanja.

### **3. ISPITANICI I POSTUPCI**

### 3.1. Ispitanici

U ovo istraživanje ukupno je uključeno 1474 ispitanika, od čega 732 ispitanika oboljela od HT-a i 742 ispitanika iz kontrolne skupine.

#### 3.1.1. Početna skupina

U početnu skupinu ukupno je uključeno 869 ispitanika, uključujući 430 ispitanika oboljelih od HT-a i 439 kontrola.

Ispitanici oboljeli od HT-a prikupljeni su u Kliničkom bolničkom centru (KBC) Split na Odjelu za nuklearnu medicinu u vremenskom razdoblju od 2013. do 2016. godine. Ovo istraživanje, uključujući i prikupljanje ispitanika oboljelih od HT-a, provedeno je u okviru HRZZ projekta „Cjelogenomska analiza povezanosti Hashimotovog tireoiditisa“, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Vesne Boraske Perice. S obzirom da snaga studije može biti povećana opreznim odabirom slučajeva tj. minimiziranjem fenotipske heterogenosti (82), proveli smo strogu procjenu statusa bolesnika prije uključivanja u studiju, slijedeći preporuke i smjernice Europske udruge za štitnjaču (engl. *European Thyroid Association*, ETA) (48). Preciznije, dijagnozu HT-a postavili su liječnici specijalisti nuklearne medicine na osnovi kliničkog pregleda, mjerenja krvnih koncentracija protutijela štitnjače (TPOAt, TgAt) i hormona štitnjače ( $T_3$ ,  $T_4$ , TSH), te nalaza ultrazvuka štitnjače, gdje je, u slučaju HT-a, tkivo štitnjače nehomogeno i često hipoehogeno zbog limfocitičke infiltracije. Klinički pregled je uključivao palpaciju i pregled vrata, a posebno donjeg prednjeg dijela vrata gdje se nalazi štitnjača. U studiju su uključeni novo dijagnosticirani pacijenti koji su se prijavili na kliniku pretežno zbog supkliničke hipotireoze, zajedno s pacijentima koji su bili na praćenju zbog ranije dijagnosticiranog HT-a.

U kontrolnu skupinu uključeni su zdravi ispitanici prikupljeni u okviru projekta "10 001 Dalmatinac – Hrvatska biobanka" koji sadrži cjelogenomske podatke, opsežnu fenotipsku bazu podataka i pohranjene biološke uzorke (83). Da bi se izbjegli problemi populacijske stratifikacije, odabrani su isključivo kontrolni ispitanici podrijetla istovjetnog bolesnicima, tj. ispitanici koji predstavljaju opću populaciju grada Splita. Iz kontrolne skupine isključeni su svi ispitanici za koje je bilo zabilježeno da boluju od HT-a ili bilo koje druge bolesti štitnjače poput Gravesove bolesti, raka štitnjače ili neautoimune hipotireoze. Također, isključeni su i

svi ispitanici čije krvne koncentracije hormona štitnjače ( $T_3$ ,  $T_4$ , TSH) nisu bile u referentnim granicama populacije ( $T_3$ : 1.3 - 3.6 nmol/L,  $T_4$ : 57.4 - 161 nmol/L, TSH: 0.3 - 3.6 mIU/L). Konačno, iz kontrolne skupine isključeni su i svi pojedinci s pozitivnim TPOAt (krvna koncentracija TPOAt-a veća od 16 IU/mL) ili TgAt (krvna koncentracija TgAt-a veća od 100 IU/mL), odnosno, pojedinci s nedijagnosticiranom autoimunom bolesti štitnjače. Na ovaj način smo isključili bolesti štitnjače iz kontrolne skupine te samim time ojačali sastav kontrolne skupine i uvelike povećali snagu i kvalitetu studije.

Informacije o demografskim i kliničkim obilježjima ispitanika oboljelih od HT-a i kontrola uključenih u početnu skupinu prikazane su u tablici 1.

Svi ispitanici uključeni u istraživanje potpisali su pismeni informirani pristanak (Dodatak 1). Ovo istraživanje odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Splitu (Dodatak 2) te Etičkog povjerenstva KBC-a Split (Dodatak 3).

**Tablica 1.** Demografska i klinička obilježja ispitanika oboljelih od HT-a i kontrola uključenih u početnu skupinu.

	Ispitanici oboljeli od HT-a	Kontrole
n*	405	433
Spol, n (%)		
Muškarci	27 (7 %)	175 (40 %)
Žene	378 (93 %)	258 (60 %)
Medijan dobi, godine (raspon)	38 (18-78)	51 (19-81)
Medijan BMI, kg/m <sup>2</sup> (raspon)	23,4 (17-41,5)	26,3 (17,6-48,2)
Medijan BSA, m <sup>2</sup> (raspon)	1,79 (1,39-2,45)	1,92 (1,46-2,61)
Medijan razine TPOAb, IU/ml (raspon)	201,5 (1-2000)	2,1 (1-16)
Median razine TgAb, IU/ml (raspon)	135,5 (5-5000)	7,1 (5-98,4)
Medijan razine TSH, mIU/L (raspon)	3,23 (0,004-100)	1,65 (0,33-3,6)
Median razine T3, nmol/L (raspon)	1,7 (0,3-4,1)	1,7 (1,3-3,2)
Medijan razine T4, nmol/L (raspon)	106 (1,5-212)	115 (70,3-161)
Medijan razine fT4, pmol/L (raspon)	12,1 (2,8-27,5)	/
Medijan volumena štitnjače, cm <sup>3</sup> (raspon)	10,83 (0,16-83,85)	/

\* n je broj ispitanika oboljelih od HT-a i kontrola nakon provođenja kontrole kvalitete uzoraka.

### **3.1.2. Replikacijske skupine**

Najznačajnije genetske varijante identificirane putem cjelogenomske analize povezanosti u početnoj skupini genotipizirane su u dvije nezavisne replikacijske skupine.

Prva replikacijska kohorta sastoji se od 184 ispitanika oboljela od HT-a i 221 kontrola prikupljenih u KBC-u Osijek na Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu, kao što je ranije opisano (84). Dijagnoza HT-a postavljena je na temelju pozitivnih TPOAt, karakterističnog nalaza ultrazvuka štitnjače te citopatološke potvrde limfocitičkog tireoiditisa provođenjem aspiracijske biopsije tankom iglom. U kontrolnu skupinu uključeni su eutiroidni ispitanici s negativnim TPOAt, urednim nalazom ultrazvuka štitnjače ili kliničkog pregleda te bez povijesti autoimunih bolesti ili endokrinoloških poremećaja. Ispitanici iz kontrolne skupine geografski su spareni s bolesnicima te predstavljaju opću populaciju grada Osijeka.

Druga replikacijska kohorta sastoji se od 82 ispitanika oboljela od HT-a prikupljena u KBC-u Split na Odjelu za nuklearnu medicinu u 2017. godini i 118 kontrola iz grada Splita koji su ranije prikupljeni u okviru projekta „10 001 Dalmatinac – Hrvatska biobanka“ (83). Ispitanici oboljeli od HT-a prikupljeni su pod istim uvjetima kao i ispitanici u početnoj skupini slučajeva, dok su za kontrolnu skupinu primijenjeni isti kriteriji uključanja i isključenja kao i za ispitanike iz početne kontrolne skupine. Svi ispitanici koji su bili uključeni u drugu replikacijsku skupinu, nezavisni su od ispitanika iz početne skupine.

## **3.2. Materijali i postupci**

### **3.2.1. Početna skupina – biokemijska mjerenja, izolacija DNA**

Uzorci plazme i seruma ispitanika uključenih u početnu skupinu prikupljeni su i pohranjeni na temperaturi od -80 °C.

Krvne koncentracije hormona i protutijela štitnjače, određene su iz plazme ispitanika s pomoću imunotesta (engl. *immunoassay*) uporabom potpuno automatiziranog uređaja "Liaison Biomedica Chemiluminescence Analyzer" (DiaSorin, Saluggia, Italija) u Laboratoriju za biokemiju KBC-a Split.

DNA je izolirana iz leukocita periferne krvi, uporabom komercijalnog kita "Nucleon BACC3 Genomic DNA Extraction Kit" (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) u Laboratoriju Katedre za medicinsku biologiju na Medicinskom fakultetu u Splitu. Koncentracija DNA određena je s pomoću spektrofotometra "Nanodrop ND-1000" (Thermo Fisher Scientific, SAD).

### **3.2.2. Početna skupina – genotipiziranje**

Genotipizaciju 430 ispitanika oboljelih od HT-a na razini čitavog genoma izvršila je genotipizacijska kompanija AROS korištenjem „Illumina Infinuim Human Core Exome“ genotipizacijske platforme (dalje u tekstu: prva platforma) koja sadrži 551 839 genetskih varijanti. Od ukupno 439 ispitanika iz kontrolne skupine, njih 349 ranije je genotipizirano u okviru projekta „10 001 Dalmatinac – Hrvatska biobanka“ (83) korištenjem „Illumina Human Omni Express Exome“ genotipizacijske platforme (dalje u tekstu: druga platforma) koja sadrži 699 957 genetskih varijanti. Preostalih 90 ispitanika iz kontrolne skupine genotipizirano je zajedno s ispitanicima oboljelim od HT-a korištenjem prve platforme. Obje genotipizacijske platforme obogaćene su egzonskim varijantama te se preklapaju u približno 250 000 genetskih varijanti.

### **3.2.3. Početna skupina – kontrola kvalitete**

S obzirom da su ispitanici genotipizirani na dvije različite platforme, kontrola kvalitete uzoraka i dobivenih genotipova provedena je posebno za obje skupine ispitanika genotipiziranih na dvije različite platforme.

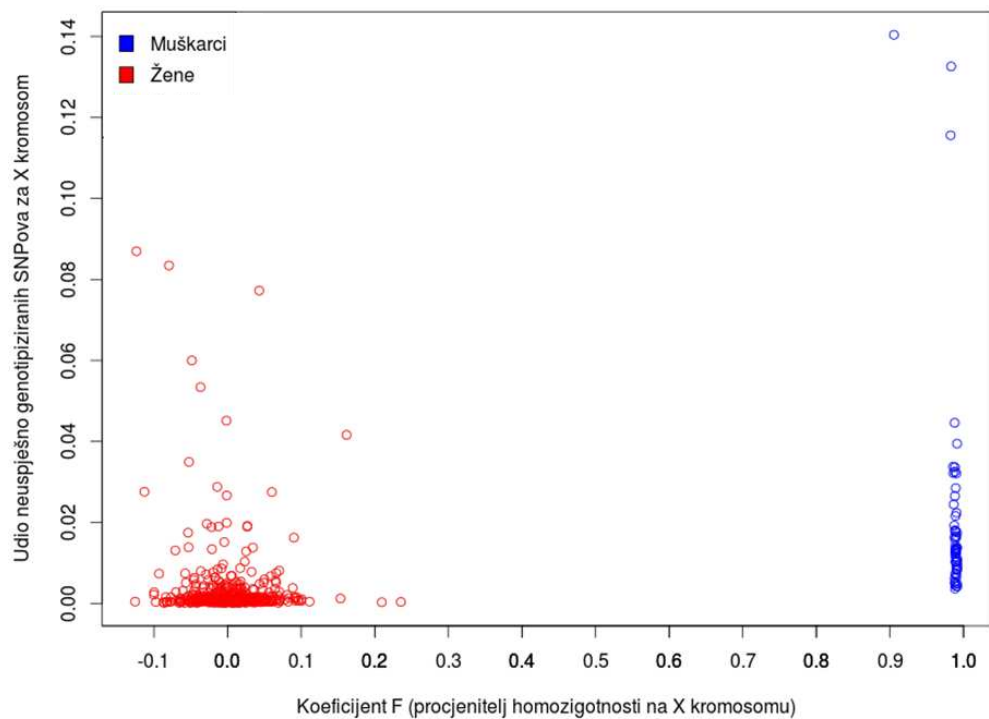
#### Kontrola kvalitete uzoraka

Kontrola kvalitete uzoraka uključivala je pet koraka: provjeru udjela uspješno genotipiziranih genetskih varijanti po uzorku, provjeru spola, provjeru udjela heterozigotnih genotipova po uzorku, provjeru etniciteta (podrijetla) i provjeru postojanja dupliciranih uzoraka.

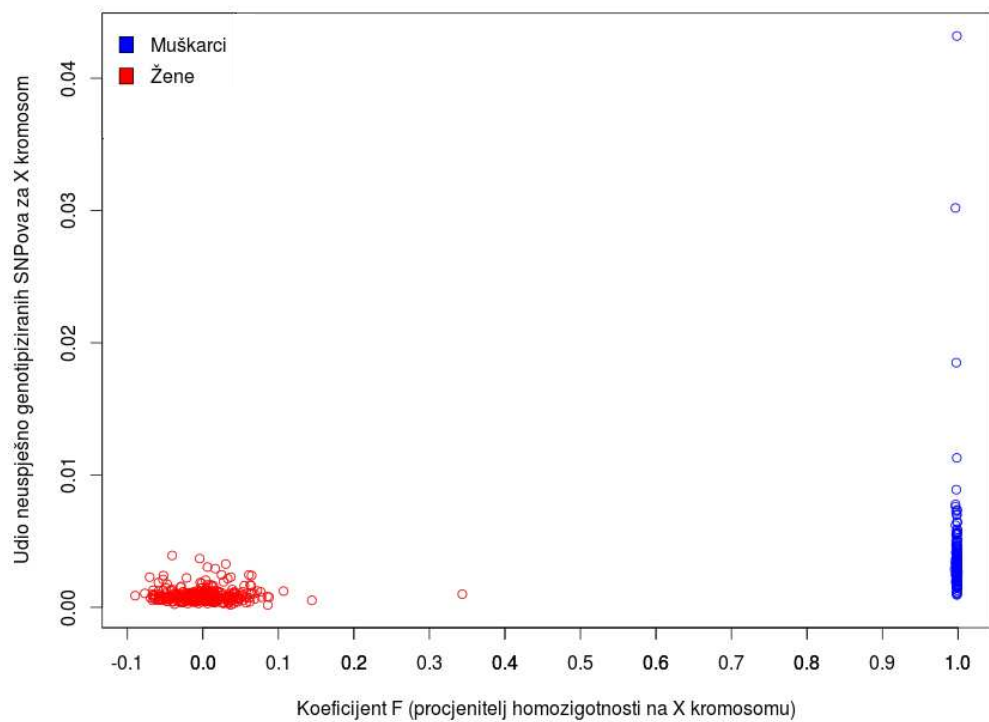
1) U prvom koraku, isključeni su svi uzorci čiji je postotak uspješnosti genotipiziranja (tj. postotak uspješno genotipiziranih genetskih varijanti po uzorku) bio manji od 95%.

2) Određivanje spola pojedinog ispitanika omogućeno je računanjem tzv. F koeficijenta koji procjenjuje homozigotnost pojedinog ispitanika na X kromosomu ( $F > 0.8$  za muški spol i  $F < 0.4$  za ženski spol), te je nakon toga napravljena usporedba s prijavljenim spolom ispitanika. Grafički prikazi provjere spola za obje skupine ispitanika nalaze se na slikama 5a i 5b. Na slikama je prikazan odnos F koeficijenta i udjela nesuspješno genotipiziranih polimorfizama s ciljem utvrđivanja razloga zašto je neki uzorak eventualno imao različiti spol od prijavljenog. Primjerice, ukoliko je za neki uzorak prijavljenog ženskog spola, F koeficijent bio 0.5 to bi značilo da se F koeficijent ne podudara s prijavljenim spolom. Međutim, ako je udio neuspješno genotipiziranih polimorfizama X kromosoma za taj uzorak bio velik, možemo zaključiti da je najvjerojatnije upravo to razlog loše procjene F koeficijenta, te da je prijavljeni spol ispravan. Graf bi uvijek na desnoj strani trebao sadržavati grupu uzoraka muškog spola poredanih jedan iznad drugog, prazninu u sredini grafa, te uzorke ženskog spola raspršene na lijevoj strani. Kao što je i vidljivo, grafovi za ispitanike obiju skupina izgledaju upravo tako, te je svim ispitanicima iz obje skupine prijavljeni i procijenjeni spol usuglašen.

3) Sljedeći korak kontrole kvalitete uzoraka uključivao je provjeru heterozigotnosti na autosomalnim kromosomima, odnosno provjeru udjela heterozigotnih genotipova po uzorku. Isključeni su svi uzorci čiji je udio heterozigotnosti bio udaljen za više od 3 standardne devijacije od prosječnog udjela heterozigotnosti među svim uzorcima. S obzirom da prva genotipizacijska platforma sadrži veći broj rijetkih genetskih varijanti (frekvencija rjeđeg alela manja ili jednaka 0.01) koje imaju znatno manji udio heterozigotnosti, za uzorke genotipizirane na toj platformi, ovaj postupak je napravljen zasebno za rijetke, a zasebno za učestale varijante (frekvencija rjeđeg alela veća od 0.01). Histogrami razdiobe udjela heterozigotnosti prikazani su na slikama 6a i 6b (za rijetke odnosno učestale varijante) za uzorke genotipizirane na prvoj platformi, odnosno na slici 7 za uzorke genotipizirane na drugoj platformi. Grafovi s informacijama o odnosu udjela heterozigotnosti i uspješnosti genotipiziranja za pojedini uzorak, te isključenim uzorcima za obje platforme prikazani su redom na slikama 8a, 8b i 9.

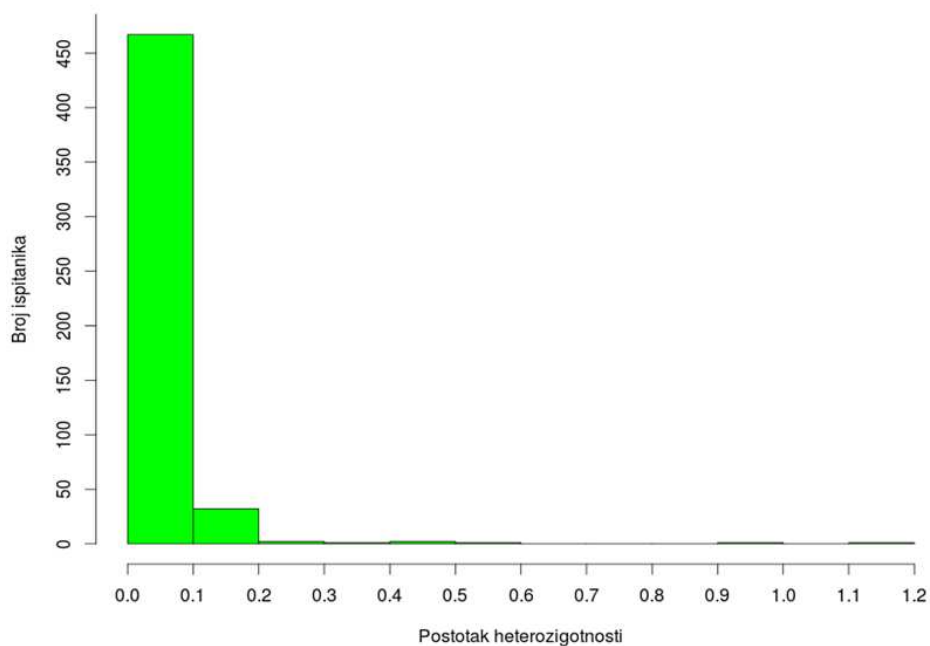


**Slika 5a.** Provera spola za ispitanike genotipizirane na prvoj platformi.

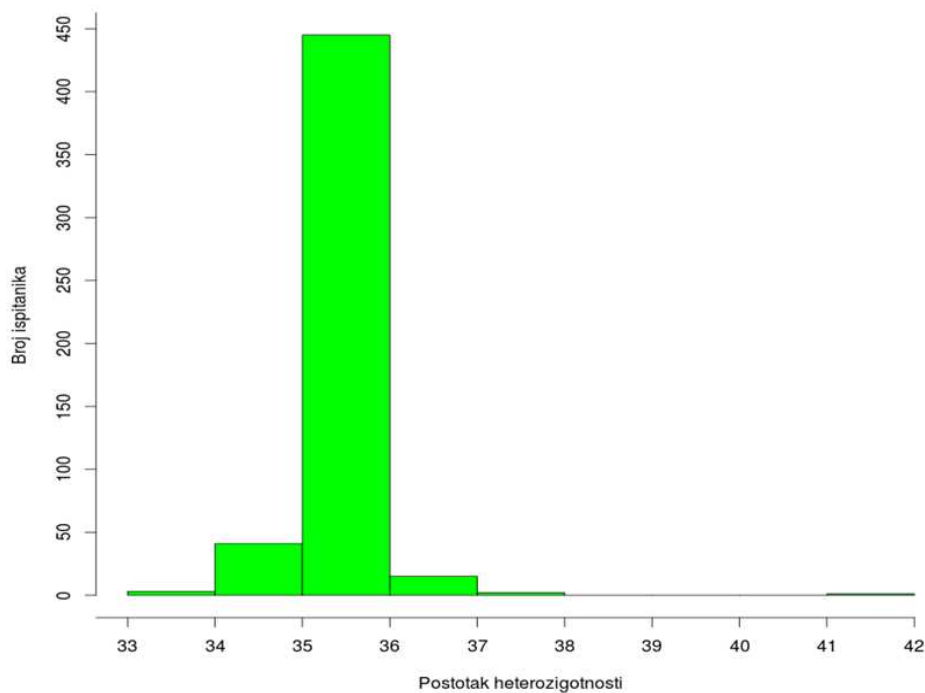


**Slika 5b.** Provera spola za ispitanike genotipizirane na drugoj platformi.

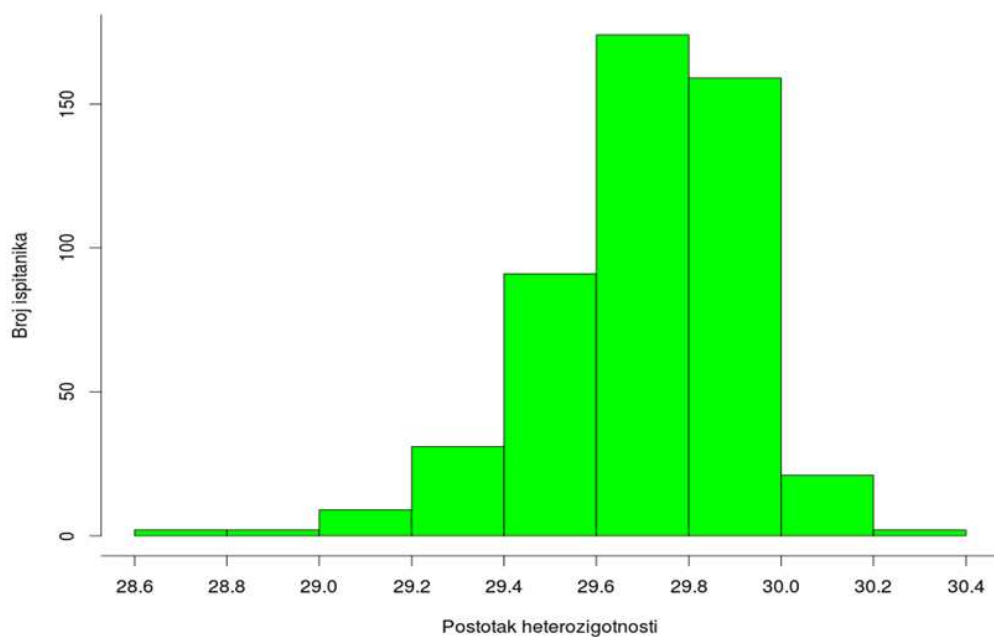




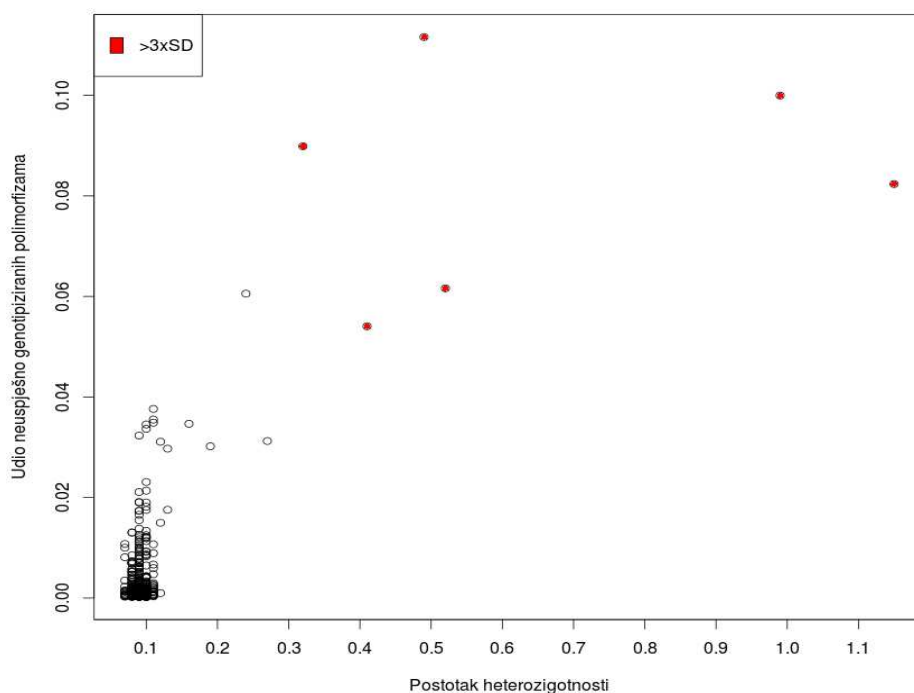
**Slika 6a.** Razdioba udjela heterozigotnosti (za rijetke varijante) za uzorke genotipizirane na prvoj platformi.



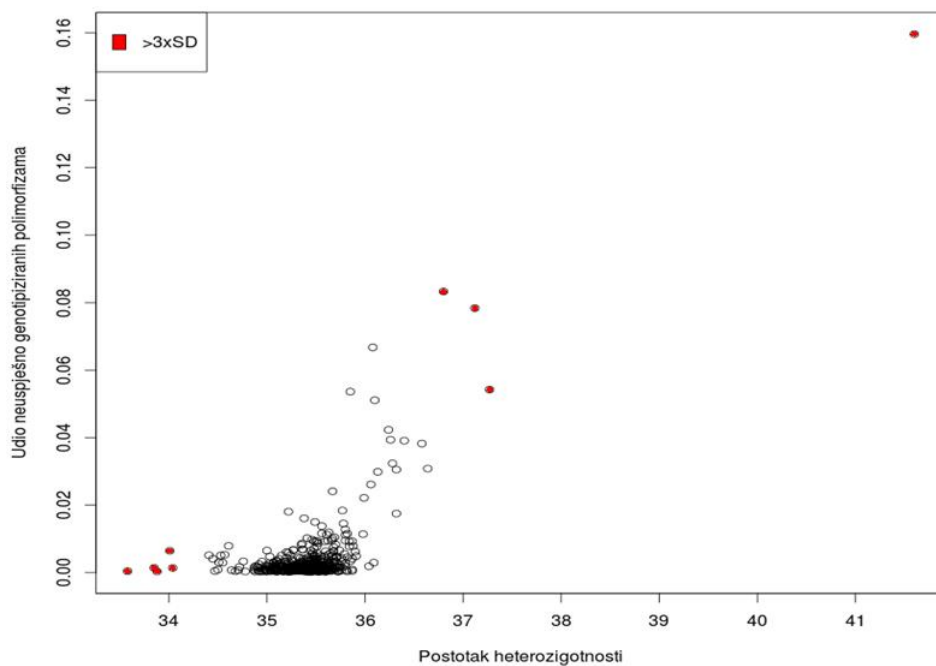
**Slika 6b.** Razdioba udjela heterozigotnosti (za česte varijante) za uzorke genotipizirane na prvoj platformi.



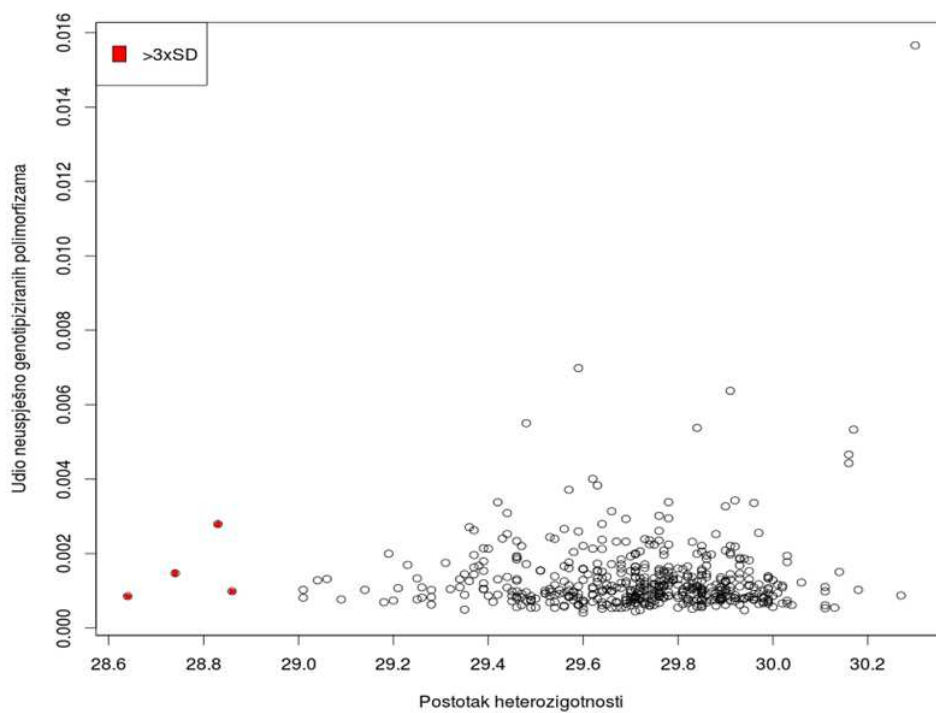
**Slika 7.** Razdioba udjela heterozigotnosti za uzorke genotipizirane na drugoj platformi.



**Slika 8a.** Odnos udjela heterozigotnosti i neuspješno genotipiziranih polimorfizama (za rijetke varijante) za uzorke genotipizirane na prvoj platformi.



**Slika 8b.** Odnos udjela heterozigotnosti i neuspješno genotipiziranih polimorfizama (za česte varijante) za uzorke genotipizirane na prvoj platformi.

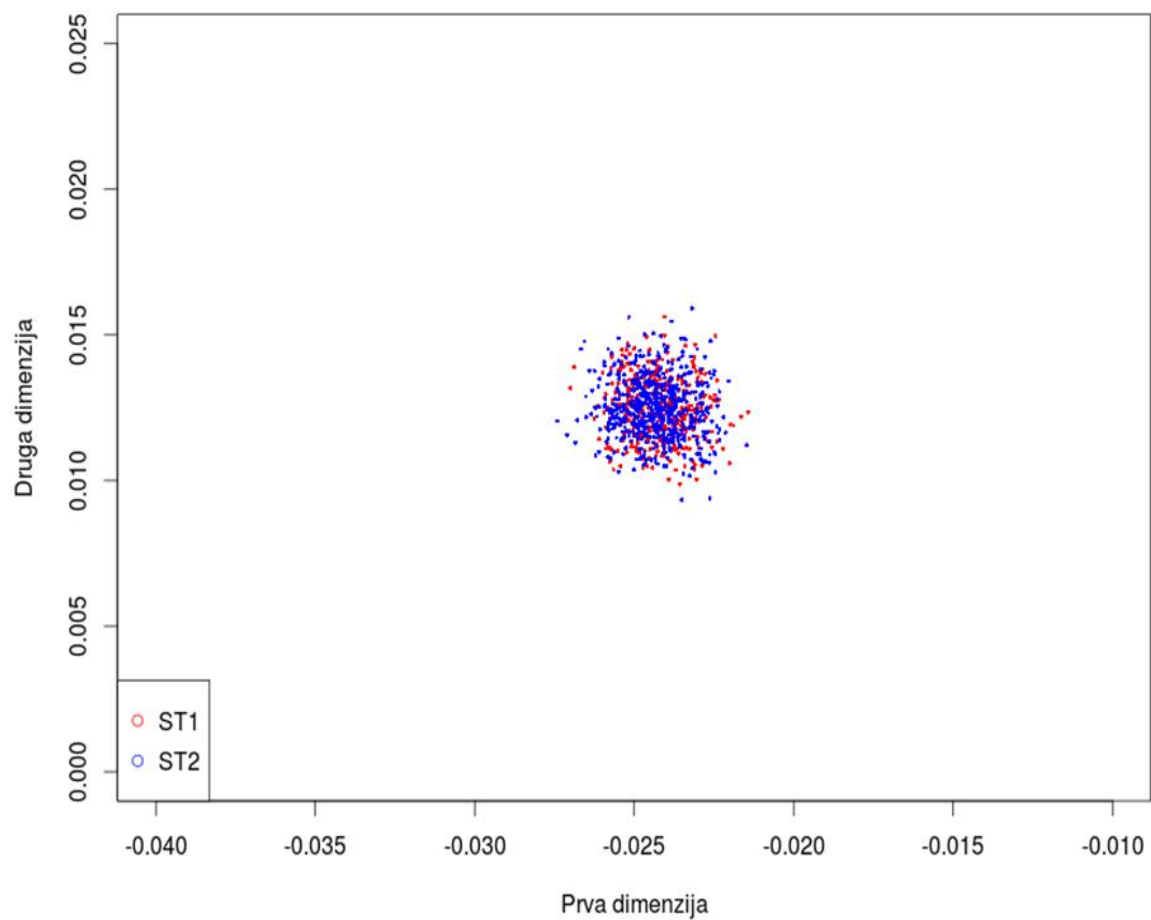


**Slika 9.** Odnos udjela heterozigotnosti i neuspješno genotipiziranih polimorfizama za uzorke genotipizirane na drugoj platformi.

4) Također, provedena je i provjera etniciteta (podrijetla) svih ispitanika uključenih u studiju s pomoću višedimenzionalne metode skaliranja (engl. *multidimensional scaling analysis*, MDS) koja računa osnovne dimenzije koje pokazuju genetičku udaljenost među ispitanicima (tzv. *identity-by-state*, IBS). MDS analiza provedena je na skupu učestalih, međusobno nezavisnih genetskih varijanti tj. varijanti koje su međusobno u ravnoteži vezanosti (engl. *linkage equilibrium*). Za obje platforme generirani su MDS grafovi na kojima su za svakog ispitanika prikazane prve dvije dimenzije iz MDS analize. Grafovi su vizualno pregledani, te su isključeni svi *outlieri*, odnosno ispitanici koji nisu istog podrijetla kao istraživana populacija (splitska regija). Na ovaj način je isključen jedan ispitanik iz prve te jedan ispitanik iz druge skupine. Na slici 10a zajedno su prikazani MDS grafovi za ispitanike genotipizirane na prvoj odnosno drugoj platformi (nakon izbacivanja navedena dva ispitanika), gdje je vidljivo da se dvije grupe ispitanika međusobno preklapaju tj. pripadaju istoj etničkoj skupini. Na slici 10b prikazan je MDS graf za sve ispitanike iz obje skupine, zajedno s MDS grafovima ostalih svjetskih populacija, iz čega je vidljivo da se ispitanici iz splitske regije koji su uključeni u ovo istraživanje grupiraju u blizini ostalih europskih populacija, tj. imaju podrijetlo blisko ostalim europskim populacijama.

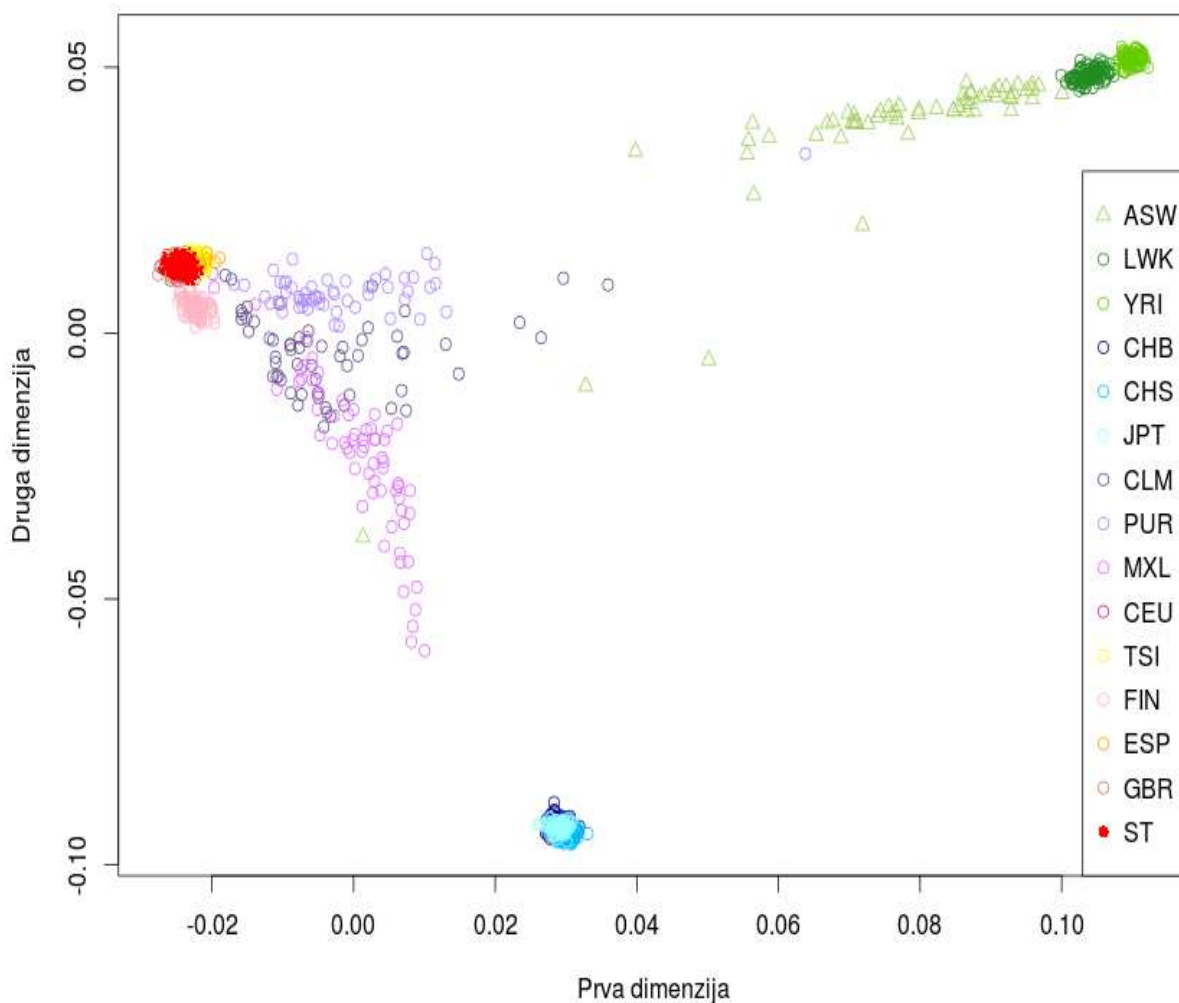
5) U sljedećem koraku kontrole kvalitete uzoraka na istom skupu učestalih, međusobno nezavisnih polimorfizama izračunati su i koeficijenti srodnosti, s ciljem isključivanja dupliciranih uzoraka tj. uzoraka čiji je koeficijent srodnosti  $\hat{\pi} \geq 0.9$ . Svi uzorci s obje platforme zadovoljili su navedeni uvjet tj. nije bilo dupliciranih uzoraka, stoga u ovom koraku nije isključen nijedan uzorak.

U konačnici je, nakon završetka procesa kontrole kvalitete uzoraka, isključeno 26 ispitanika genotipiziranih na prvoj platformi (od čega 25 ispitanika oboljelih od HT-a i jedan ispitanik iz kontrolne skupine), te 5 ispitanika iz kontrolne skupine genotipiziranih na drugoj platformi. Stoga se u cjelogenomskoj analizi povezanosti analiziraju genotipovi 838 ispitanika, koji uključuju 405 ispitanika oboljelih od HT-a te 433 ispitanika iz kontrolne skupine.



**Slika 10a.** Usporedba MDS grafova ispitanika genotipiziranih na prvoj i drugoj platformi.

Legenda: ST1-Ispitanici iz splitske regije genotipizirani na prvoj platformi, ST2-Ispitanici iz splitske regije genotipizirani na drugoj platformi.



**Slika 10b.** Usporedba MDS grafa ispitanika genotipiziranih na obje platforme s MDS grafovima ostalih svjetskih populacija iz referentnog panela „1000 Genomes“.

Legenda: **ASW**-Ispitanici s jugozapada SAD-a afričkog podrijetla, **LWK**-Pripadnici kenijskih plemena Luhya (kenijske etničke skupine), **YRI**-Pripadnici nigerijske etničke skupine Yoruba, **CHS**-Kinezi iz Pekinga, **JPT**-Japanci, **CLM**-Kolumbijci, **PUR**-Portorikanci, **MXL**-Meksikanci iz Los Angelesa, **CEU**-Stanovnici Utaha (SAD) zapadno europskog podrijetla, **TSI**-Stanovnici talijanske regije Toskane, **FIN**-Finci, **GBR**-Britanci iz Engleske i Škotske, **ESP**-Španjolci, **ST**-Svi ispitanici iz splitske regije uključeni u početnu skupinu ovog istraživanja.

### Kontrola kvalitete genotipova:

Kontrola kvalitete genotipova uključivala je tri koraka: provjeru uspješnosti genotipiziranja, provjeru Hardy-Weinbergove ravnoteže i provjeru frekvencije rjeđeg alela.

1) Isključene su sve genetske varijante čiji je postotak uspješnosti genotipiziranja (tj. postotak uspješno genotipiziranih uzoraka za tu genetsku varijantu) bio manji od 98%.

2) Isključene su i sve genetske varijante koje nisu bile u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži ( $p < 0.0001$ ).

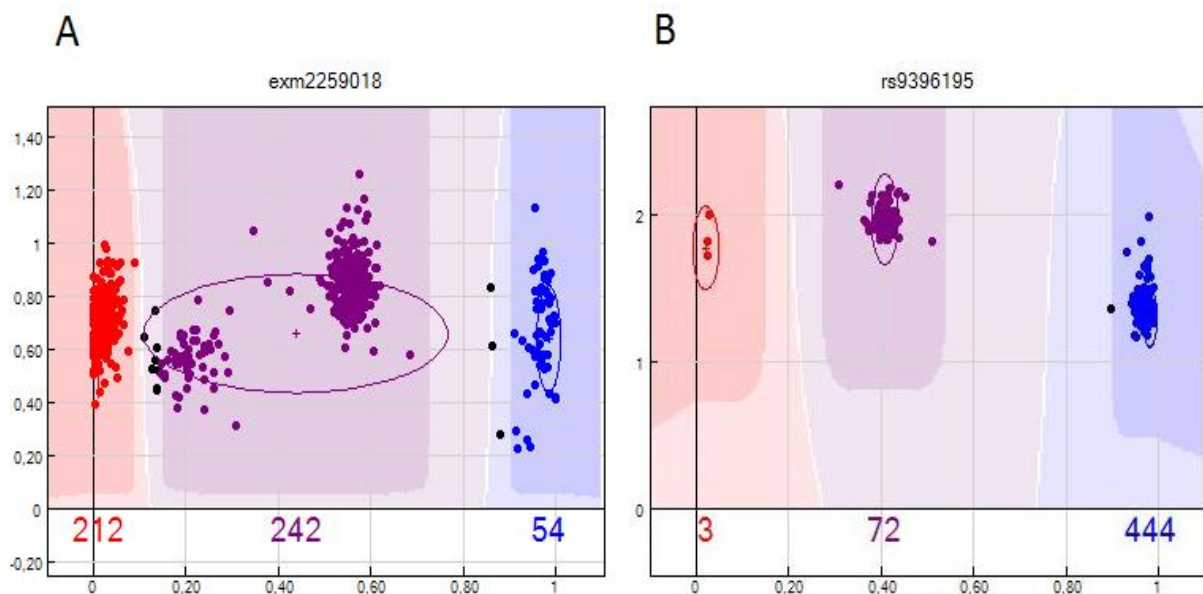
3) Također, isključene su i sve genetske varijante čija je frekvencija rjeđeg alela kod kontrola značajno odstupala od frekvencije rjeđeg alela za ispitanike europskog podrijetla iz projekta „1000 Genomes“ (razlika u frekvenciji rjeđeg alela veća od 0.2).

Za ne-pseudoautosomalne regije X kromosoma, sva tri navedena koraka kontrole kvalitete genotipova provedena su zasebno i isključivo na ispitanicima ženskog spola te su isključeni svi polimorfizmi koji su odstupali od kriterija provjere. Također, na X kromosomu su isključeni svi heterozigotni genotipovi ispitanika muškog spola.

U konačnici je, nakon završetka procesa kontrole kvalitete genotipova, isključeno 29 082 genetskih varijanti s prve platforme i 14 839 genetskih varijanti s druge platforme. Na taj način je na prvoj platformi preostalo 522 757 genetskih varijanti, a na drugoj platformi 685 568 genetskih varijanti, nakon čega su pročišćeni cjelogenomski podaci obje skupine ispitanika spojeni na skupu od 250 834 zajedničkih polimorfizama između dviju platformi. Na tom skupu zajedničkih direktno genotipiziranih genetskih varijanti, provedena je preliminarna analiza povezanosti genotipova s bolešću, te su vizualno pregledani klaster grafovi (grupiranje uzoraka prema tri genotipa) svih genetskih varijanti koje su dosegle značajnost  $P < 10^{-4}$ . Genetske varijante s klaster grafovima loše kvalitete su isključene, s ciljem smanjivanja mogućih grešaka pri imputaciji koje mogu proizaći iz loše genotipiziranih polimorfizama tj. s ciljem poboljšanja točnosti imputacije. Na slici 11 dani su primjeri dvaju polimorfizama s klaster grafovima loše odnosno dobre kvalitete.

S obzirom da izrazito rijetke genetske varijante ne povećavaju točnost imputacije, u zadnjem koraku pripreme podataka za imputaciju isključene su i sve genetske varijante s apsolutnom frekvencijom rjeđeg alela (tj. s brojem pojavljivanja rjeđeg alela) 0 ili 1.

Pri provođenju svih opisanih koraka u procesu kontrole kvalitete korišteni su računalni programi R (Foundation for Statistical Computing, Beč, Austrija), Python (Python Software Foundation), PLINK (85), GTOOL (Genetics Software Suite, The University of Oxford, UK), SNPTEST (86), Evoker (87), GenomeStudio (Illumina Inc., San Diego, SAD) i Perl (The Perl Foundation).



**Slika 11.** Primjeri klaster grafova dviju genetskih varijanti.

Objašnjenje slike: Klaster graf genetske varijante prikazuje fluorescentne signale za svaki uzorak DNA, s pomoću kojih se svakom uzorku dodjeljuje genotip. Svaka točka predstavlja jedan uzorak koji se na grafu pozicionira ovisno o razinama dviju fluorescencija kojima su označene genotipizacijske probe za svaki alel pojedinog polimorfizma, te bi se sve točke trebale grupirati u tri odvojene skupine odnosno klastera koji predstavljaju tri različita genotipa. Crvenom odnosno plavom bojom su označeni homozigotni genotipovi, ljubičastom bojom su označeni heterozigotni genotipovi, dok su crnom bojom označeni uzorci kojima nije dodijeljen genotip. Na slici A nalazi se primjer klaster grafa loše genotipizirane genetske varijante, s obzirom da postoje četiri, a ne tri jasno odvojena klastera, dok se na slici B nalazi klaster graf dobre kvalitete.



### 3.2.4. Početna skupina – imputacija genotipova

Imputacija genotipova je složena statistička metoda koja, korištenjem haplotipova, računa vjerojatnosti genotipova za genetske varijante koje nisu direktno genotipizirane. Na taj način se povećava broj genetskih varijanti koje se mogu analizirati, pa se time uvelike povećava snaga cjelogenomske studije i vjerojatnost pronalaska značajnih genetskih varijanti povezanih s bolešću.

S ciljem dobivanja haplotipova i zbog ubrzanja računalno složenog procesa imputacije, iz genotipova direktno genotipiziranih genetskih varijanti najprije su statistički procijenjeni haplotipovi korištenjem računalnog programa SHAPEIT2 u koji je implementiran specijalni algoritam za procjenu haplotipova baziran na skrivenom Markovljevom modelu (88). Nakon toga su iz dobivenih haplotipova, izračunate vjerojatnosti genotipova za genetske varijante koje nisu bile direktno genotipizirane korištenjem računalnog programa IMPUTE2 (89). Poznati haplotipovi koji su se koristili u procesu imputacije preuzeti su s javno dostupnog referentnog panela „1000 Genomes“.

S obzirom da je imputacija računalno izrazito složen proces koji zahtijeva jako puno vremena i memorije, genom je najprije podijeljen na manje regije veličine 3 000 000 parova baza. Na taj način dobivene su 922 genomske regije, koje su potom zasebno imputirane. Veličina imputacijskog prozora postavljena je na 250 000 parova baza, što znači da su genetske varijante unutar pojedine regije imputirane pomoću ostalih varijanti u toj regiji, ali i direktno genotipiziranih genetskih varijanti koje su se nalazile u blizini te regije tj. unutar intervala od 250 000 parova baza ispred odnosno iza promatrane regije. Na taj način je poboljšana točnost imputacije za varijante koje su se nalazile na rubovima regije. Osamnaest regija nije sadržavalo nijednu direktno genotipiziranu genetsku varijantu, te stoga nisu bile imputirane. To su bile centromerne regije ili regije na počecima odnosno krajevima kromosoma. Stoga su na serveru u jednom trenutku poslana 904 procesa, svaki za imputaciju jedne regije. Procesu su, ovisno o broju genetskih varijanti koje se nalaze u pojedinoj regiji, zahtijevali od 4 Gb do 22 Gb radne memorije servera, a vrijeme izvršavanja pojedinog procesa je variralo od 3 do 15 sati. S obzirom da ukupna radna memorija našeg servera iznosi 256 Gb, u prosjeku se u jednom trenutku paralelno izvršavalo 10-30 procesa. Raspored izvršavanja svih procesa na serveru konfiguriran je s pomoću servisa sustava za upravljanje poslovima SLURM. Ukupno je

za izvršavanje sva 904 procesa trebalo oko 250 sati, odnosno oko 10 dana. Nakon završetka, provjerena je uspješnost svakog poslanog procesa, te su neuspješno izvršeni procesi ponovno poslani na server.

S obzirom da se algoritmi za procjenu haplotipova i imputaciju ne-pseudo-autosomalnih regija X kromosoma razlikuju od algoritama za ostale kromosome, proces procjene haplotipova i imputacije tih regija proveden je zasebno. Ne-pseudo autosomalne regije X kromosoma podijeljene su na 50 regija, od kojih nijedna nije bila prazna, a cijeli proces imputacije tih regija trajao je oko 30 sati.

Nakon završetka procesa imputacije, provedena je kontrola kvalitete imputiranih genotipova. U prvom koraku isključene su sve rijetke genetske varijante (frekvencija rjeđeg alela u skupini svih ispitanika manja ili jednaka 0.01).

Zatim je procijenjena točnost imputacije za svaku imputiranu genetsku varijantu, računanjem tzv. INFO koeficijenta (realni broj između 0 i 1, što je broj bliži 1, točnost imputacije je veća). Isključene su sve genetske varijante s niskom točnosti imputacije, tj. varijante s INFO koeficijentom manjim od 0.4.

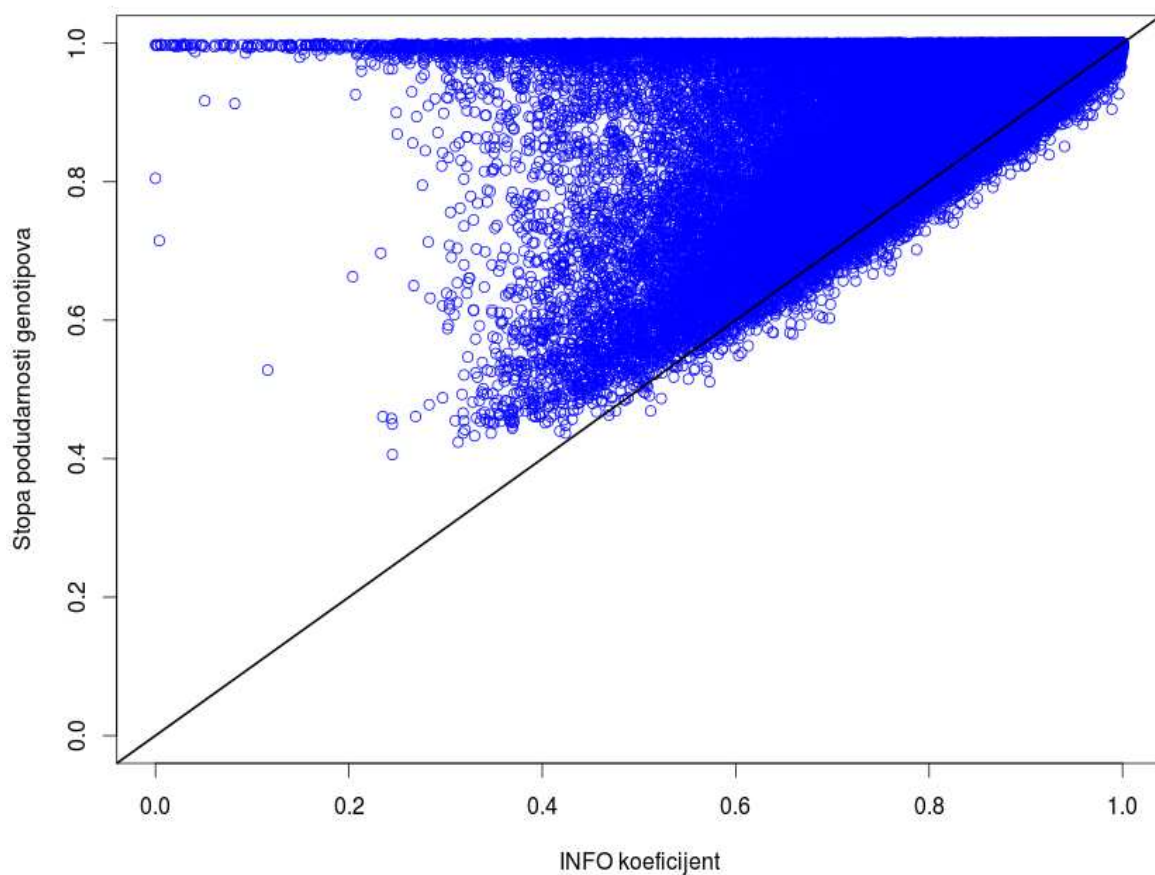
Potom je provedena i imputacija svih direktno genotipiziranih genetskih varijanti, na način da su najprije zamaskirani svi genotipovi pojedine varijante te su onda isti imputirani korištenjem genotipova ostalih direktno genotipiziranih varijanti. Na ovaj način je uspoređena podudarnost originalnih i imputiranih genotipova u svakoj imputiranoj regiji te je provjerena ukupna točnost i kvaliteta imputacije. Prosječna podudarnost genotipova u našem uzorku bila je 95.51%.

Za dodatnu provjeru točnosti imputacije u našem uzorku, uspoređena je i podudarnost originalnih i imputiranih genotipova za 93 168 genetskih varijanti u 85 ispitanika koji su ranije bili dodatno genotipizirani korištenjem "Illumina Human CNV370" genotipizacijske platforme. Prosječna podudarnost genotipova iznosila je 99.98% što dodatno potvrđuje visoku kvalitetu i točnost procesa imputacije provedenog u ovom istraživanju.

Također, za svaku direktno genotipiziranu genetsku varijantu uspoređena je stopa podudarnosti genotipova i INFO koeficijent, s ciljem otkrivanja loše genotipiziranih varijanti (slika 12).

Provođenjem imputacije genotipova ukupni broj genetskih varijanti čija se povezanost s HT-om testira u cjelogenomskoj analizi povezanosti povećan je na 8 621 046 (8 386 895 genetskih varijanti na autosomalnim kromosomima i pseudo-autosomalnim regijama X kromosoma te 234 151 genetskih varijanti na ne-pseudoautosomalnim regijama X kromosoma). Ovime se uvelike povećala snaga ovog istraživanja te vjerojatnost pronalaska značajnih genetskih varijanti povezanih s HT-om.

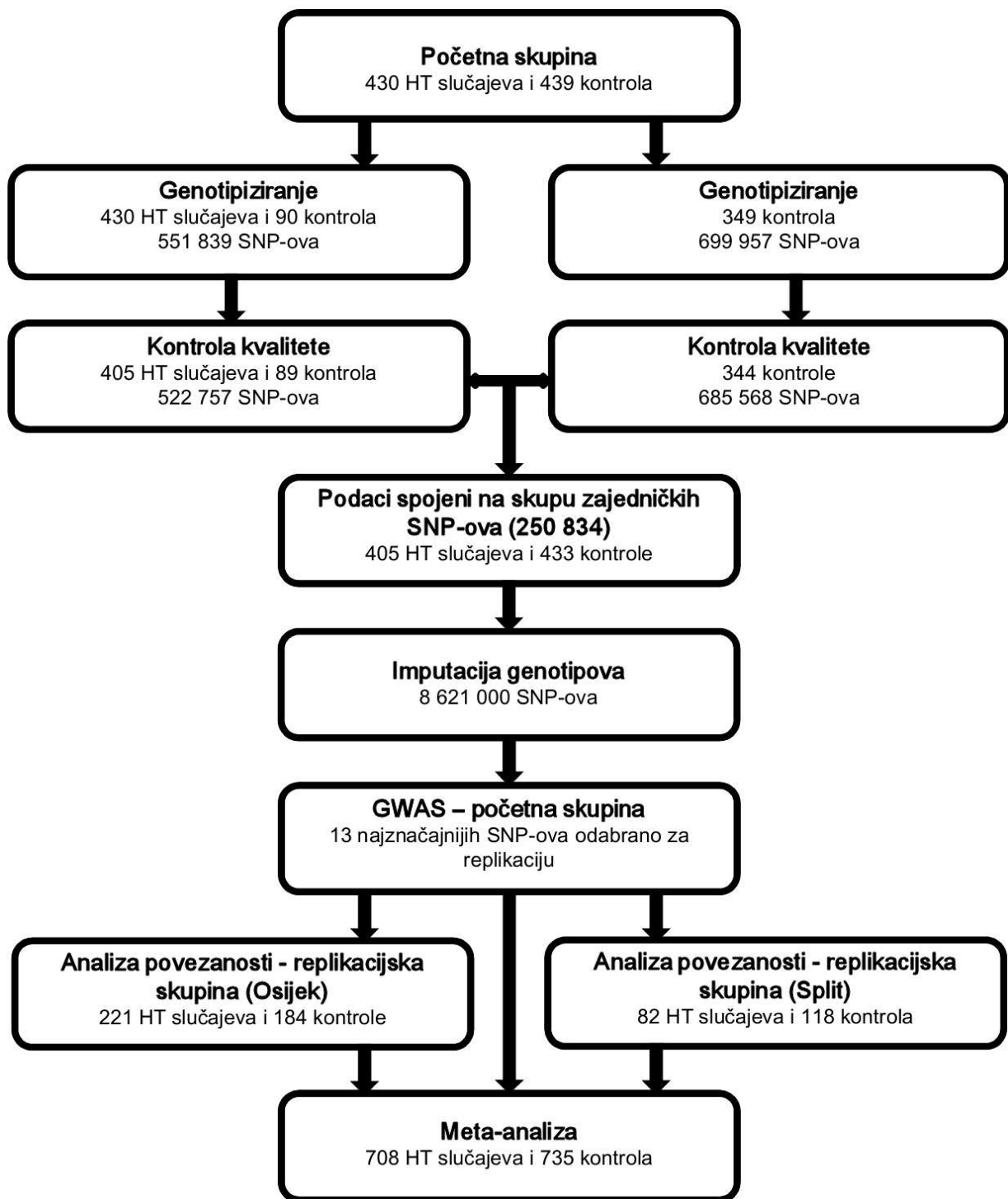
Cijeli proces genotipiziranja, kontrole kvalitete i imputacije, zajedno s nacrtom cijelog istraživanja, prikazan je na slici 13.



**Slika 12.** Usporedba stope podudarnosti genotipova i INFO koeficijenta direktno genotipiziranih genetskih varijanti.

Objašnjenje slike: Ukoliko je INFO koeficijent za neku genetsku varijantu visok, to bi značilo da je točnost imputacije za tu genetsku varijantu također bila visoka. Međutim, ako je stopa

podudarnosti originalnih i imputiranih genotipova za istu genetsku varijantu niska (tj. osjetno niža od INFO koeficijenta) to bi značilo da se imputirani genotipovi slabo podudaraju s originalnim genotipovima. S obzirom da je imputacija dobro provedena, a originalni i imputirani genotipovi se slabo podudaraju, slijedi da je promatrana genetska varijanta loše genotipizirana. Stoga, za direktno genotipizirane genetske varijante, stopa podudarnosti genotipova ne bi smjela biti značajno niža od INFO koeficijenta tj. sve točke na grafu bi se morale nalaziti iznad (stopa podudarnosti je veća od INFO koeficijenta) ili u relativnoj blizini (stopa podudarnosti i INFO koeficijent se previše ne razlikuju) pravca  $y=x$ . Iz gornjeg grafa je vidljivo da sve točke, odnosno direktno genotipizirane genetske varijante, zadovoljavaju navedene uvjete. Također se može primijetiti da postoji određen dio varijanti s niskim INFO koeficijentom i sto postotnom stopom podudarnosti genotipova. To su pretežito izrazito rijetke genetske varijante (kod kojih se rjeđi alel pojavljuje kod svega nekoliko ispitanika) čija je imputacija nepouzdana, pa je samim time i INFO koeficijent nizak. Bitno je napomenuti i da nijedna od direktno genotipiziranih genetskih varijanti nije bila izbačena, jer one nisu originalno bile imputirane, već je njihova imputacija provedena naknadno, isključivo s ciljem provjere ukupne točnosti imputacije te otkrivanja loše genotipiziranih varijanti (kojih nije bilo, kao što je i vidljivo na gornjem grafu).



Slika 13. Nacrt istraživanja.

### 3.2.5. Početna skupina – cjelogenomska analiza povezanosti HT-a

Analiza povezanosti provedena je između svake od 8 621 046 imputiranih genetskih varijanti i HT-a, korištenjem računalnog programa GEMMA (90).

Za autosomalne kromosome i pseudo-autosomalne regije X kromosoma, korišten je model univarijatne linearne regresije sa slučajnim učincima koji uzima u obzir populacijsku stratifikaciju i srodstvo. Status bolesti, koji predstavlja binarnu varijablu, tretiran je kao kvantitativna varijabla, a model je prilagođen za dob i spol. Formula uporabljenog modela je

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 C_1 + \alpha_2 C_2 + \beta X + U + \varepsilon,$$

gdje  $Y$  predstavlja status bolesti za  $n$  ispitanika ( $Y = 0$  za kontrole i  $Y = 1$  za slučajeve),  $\alpha_0$  je slobodni koeficijent,  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  su koeficijenti regresije za kovarijante  $C_1$  (vektor duljine  $n$  koji predstavlja dob) i  $C_2$  (vektor duljine  $n$  koji predstavlja spol),  $X$  je vektor koji sadrži  $n$  genotipova testirane genetske varijante (imputirani prosječni genotipovi vrijednosti između 0 i 2),  $\beta$  je veličina učinka testirane genetske varijante,  $U$  je vektor duljine  $n$  koji sadrži slučajne učinke i koji je određen s pomoću  $n \times n$  centrirane matrice srodstva,  $\varepsilon$  je vektor reziduala (pogrešaka) duljine  $n$ . Centrirana matrica srodstva izračunata je s pomoću centriranih genotipova 244 333 direktno genotipizirane autosomalne genetske varijante uporabom računalnog programa GEMMA (90).

Razina značajnosti povezanosti između svake testirane genetske varijante i HT-a (tj.  $P$ -vrijednost) izračunata je s pomoću Waldove testne statistike.

Za ne-pseudo-autosomalne regije X kromosoma, analiza povezanosti provedena je odvojeno za ispitanike muškog (genotipovi muškaraca za polimorfizme u ovim regijama kodirani su s 0 ili 2) i ženskog spola. U spomenutim analizama korišten je isti model univarijatne linearne regresije sa slučajnim učincima kao i za autosomalne kromosome, s jedinom razlikom što u ovom slučaju spol nije bio uključen kao kovarijanta. Rezultati odvojenih analiza su zatim kombinirani i meta-analizirani korištenjem Stoufferove metode koja u obzir uzima  $P$ -vrijednosti i smjer učinka polimorfizma te zatim ponderira prema veličinama uzoraka u obje grupe ispitanika (91, 92). Testna  $Z$ -statistika za testirani polimorfizam u meta-analizi računa se s pomoću formule

$$Z = \frac{\sum_{i=1}^2 Z_i \sqrt{N_i}}{\sqrt{\sum_{i=1}^2 N_i}},$$

gdje je  $N_i$  veličina uzorka u  $i$ -toj grupi (prva grupa-ispitanici muškog spola, druga grupa-ispitanici ženskog spola), a  $Z_i = \Phi^{-1}\left(\frac{P_i}{2}\right) * \text{sign}(\beta_i)$ , gdje je  $\Phi$  oznaka za funkciju distribucije jedinične normalne slučajne varijable,  $P_i$  označava  $P$ -vrijednost testiranog polimorfizma u  $i$ -toj grupi, a  $\text{sign}(\beta_i)$  predstavlja predznak tj. smjer učinka testiranog polimorfizma u  $i$ -toj grupi.

Značajnost testiranog polimorfizma u meta-analizi odnosno pripadna  $P$ -vrijednost računa se upotrebom formule

$$P = 2\Phi(-|Z|).$$

S obzirom da je u obje grupe ispitanika broj slučajeva i kontrola bio različit, efektivna veličina uzorka ( $N$ ) u obje grupe izračunata je korištenjem formule

$$N = \frac{4N_{\text{slučajeva}}N_{\text{kontrola}}}{N_{\text{slučajeva}} + N_{\text{kontrola}}}.$$

Meta-analiza je provedena uporabom računalnog programa METAL (91).

Manhattan graf, koji prikazuje rezultate cjelogenomske analize povezanosti za sva 23 kromosoma, i kvantil-kvantil graf (engl. *quantile-quantile graph*, *q-q graph*), koji prikazuje odnose očekivanih i dobivenih  $P$  vrijednosti iz cjelogenomske analize povezanosti, dobiveni su korištenjem R paketa 'qqman'.

### 3.2.6. Replikacijske skupine – biokemijska mjerenja, izolacija DNA

Za ispitanike iz prve replikacijske skupine iz Osijeka, krvne koncentracije hormona štitnjače izmjerene su iz jutarnjih uzoraka seruma, uzetih između 8 i 12 sati, s pomoću imunotesta uporabom uređaja "VITROS ECI Immunodiagnostic System" (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, SAD), prema uputama proizvođača.

DNA je izolirana iz leukocita periferne krvi, uporabom komercijalnog kita "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka), prema uputama

proizvođača. Koncentracija DNA određena je s pomoću spektrofotometra "IMPLEN NanoPhotometer P330" (Implen GmbH, Munchen, Njemačka).

Za ispitanike iz druge replikacijske skupine iz Splita, mjerenja krvnih koncentracija hormona i protutijela štitnjače te izolacija DNA izvršeni su na isti način kao i za početnu skupinu.

### **3.2.7. Replikacijske skupine – genotipiziranje i analiza povezanosti odabranih genetskih varijanti**

Na osnovi rezultata cjelogenomske analize povezanosti HT-a u početnoj skupini, odabrali smo najznačajnije nezavisne genetske varijante za genotipizaciju i analizu povezanosti u dvije replikacijske skupine. Odabrali smo po jednu najznačajniju genetsku varijantu iz svakog genetskog signala koja je ispunjavala jedan od sljedeća dva uvjeta: 1)  $P < 10^{-6}$ , 2)  $10^{-6} \leq P < 10^{-5}$  i frekvencija rjeđeg alela je veća od 0.01 za ispitanike oboljele od HT-a i za ispitanike iz kontrolne skupine. Na ovaj način odabrano je ukupno 13 genetskih varijanti za replikaciju.

Od 13 odabranih genetskih varijanti, njih 11 genotipizirano je s pomoću tzv. RealTime PCR tehnike (engl. *real-time polymerase chain reaction*) i unaprijed razvijenih TaqMan SNP genotipizacijskih proba. Genotipizacija je izvršena u laboratoriju Katedre za medicinsku biologiju na Medicinskom fakultetu u Splitu. U sterilnoj komori s laminarnim protokom zraka pripravljena je reakcijska smjesa za PCR koji je proveden na RealTime PCR uređaju „ABI PRISM 7500 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Reakcijska smjesa sadržavala je 5  $\mu$ l univerzalnog Master Mixa za genotipizaciju polimorfizama, 0.125  $\mu$ l TaqMan SNP smjese genotipizacijskih proba i početnica za svaki od 11 polimorfizama, 0.125  $\mu$ l Tris-EDTA pufera, te 4.25  $\mu$ l destilirane vode. Potom je u svaku jažicu dodano 0.5  $\mu$ l genomske DNA. U svrhu negativne kontrole u prvu i zadnju jažicu umjesto genomske DNA dodano je 0.5  $\mu$ l destilirane vode. PCR mikrotitarska pločica potom je zatvorena optičkom folijom i kratko centrifugirana prije stavljanja u uređaj za RealTime PCR. Odabirom programa definirani su uvjeti reakcije i započeto je umnažanje uz vidljivi porast fluorescencije u odnosu na broj ciklusa umnožavanja. Ciljne sekvence (sekvence TaqMan genotipizacijskih proba) za svaki od 11 polimorfizama prikazane su u tablici 2.



**Tablica 2.** Popis ciljnih sekvenci za 11 polimorfizama genotipiziranih RealTime PCR metodom.

Polimorfizam	Ciljna sekvenca
rs1381882	AAAGTCTGTGTAATTAATTTTTT[A/T]AAAAAAGTTGTGACAGGTATAAAA
rs791903	GCATCCCAAGCCCTGTCCCAGGCCT[C/G]AGGGTCCCGCCATCCTCCTTGGCTT
rs12944194	AAAGTCAGTGCAAGGGTACAGGCA[C/T]AGGCTGGAATGCCCTTCTAGAGAGT
rs16984968	AGGAATTAATCAATTTCCAATTTCA[A/G]AGAGAGATTGGCAAATTGTTCCAGG
rs7789923	ACTGGGACCAAGCCCAT[G/C]ATTTGGAATGAAACCT
rs75201096	CTAGAATTCAATACCCAGACAAATA[C/T]TGATCAAGTCTAAGGGCAGAATAAG
rs76295792	AACTTGTTAACTCACTTTTGGTGCA[C/T]TGAAGAGTTCAAACACCATTCCCCA
rs72781984	AGAGAGAATGAGCATGAAGGGAAGA[A/C]GGGAGGAAGATTCTGGTCTTCAGCT
rs1326443	GCACTGATCATAATTCAAAGAAA[A/C]CTGTGTGAAGATTTATTACAATTAC
rs78091045	GCCTAAGACCCTCAT[C/G]TTGTGCCAAATTAAGNAAA
rs13231070	TTATTTATTT[A/T]TTNTTTATTT

Genotipovi dviju preostalih odabranih genetskih varijanti (rs72799515 unutar *TET1* gena i rs4148254 unutar *UGT8* gena) dobiveni su s pomoću PCR tehnike i sekvencioniranja po Sangeru, kao što je ranije opisano (93). Genotipizacija je izvršena na Institutu za humanu genetiku Medicinskog centra u Hamburgu (Njemačka). Ukratko, dizajnirane su DNA početnice za umnožavanje dijelova egzona *TET1* i *UGT8* gena, i to redom egzona 4 i 2. Specifični slijedovi početnica za PCR umnožavanje bili su 5'-tcagaagcccatcagagaattcc-3' i 5'-catgtgacaaggcttgttggtg-3' za *TET1*, odnosno 5'-aactgtgacctgatggttgca-3' i 5'-catgtgacaaggcttgttggtg-3' za *UGT8*. Referentni DNA slijedovi NM\_030625.2 (*TET1*) i NM\_001128174.2 (*UGT8*), preuzeti iz javno dostupne „GenBank“ baze DNA sekvenci, korišteni su za usporedbu u svim analizama. Produkti PCR-a direktno su sekvencionirani uporabom uređaja „ABI 3730 DNA Analyzer, BigDye chemistry v3.1“ (Applied Biosystems, Foster City, SAD). Odsječci sekvenci DNA sastavljeni su, poravnati i analizirani uporabom računalnog programa Seqman (DNASTAR Lasergene, Madison, SAD).

Nakon određivanja genotipova svih 13 odabranih genetskih varijanti provedena je kontrola kvalitete dobivenih genotipova, zasebno u obje replikacijske skupine. Sve genetske varijante su bile u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži ( $P > 0.05$ ), a postotak uspješnosti genotipiziranja za svaku varijantu bio je 100%. Stoga su sve odabrane genetske varijante zadovoljile kontrolu kvalitete te su uključene u analizu povezanosti s HT-om.

Analiza povezanosti između svake od 13 odabranih genetskih varijanti i HT-a provedena je zasebno u obje replikacijske skupine uporabom modela univarijatne linearne regresije prilagođenog za dob i spol. Status bolesti je, kao i u inicijalnoj cjelogenomskoj analizi povezanosti, tretiran kao kvantitativni fenotip. Analize povezanosti provedene su korištenjem računalnog programa R (Foundation for Statistical Computing, Beč, Austrija).

### 3.2.8. Meta-analiza između početne skupine i replikacijskih skupina

Meta-analiza za 13 odabranih genetskih varijanti između početne kohorte i dviju replikacijskih kohorti provedena je s pomoću računalnog programa R (Foundation for Statistical Computing, Beč, Austrija) korištenjem metode inverzne varijance sa stalnim učincima. Ova metoda uzima u obzir veličine učinaka testiranog polimorfizma iz svake od uključenih kohorti te zatim ponderira prema standardnim greškama (91). Konačna veličina učinka testiranog polimorfizma u meta-analizi ( $\beta$ ) i pripadna standardna greška ( $SE$ ) u meta-analizi procjenjuju se s pomoću formula

$$\beta = \frac{\sum_{i=1}^3 \beta_i \omega_i}{\sum_{i=1}^3 \omega_i}, \quad SE = \sqrt{\frac{1}{\sum_{i=1}^3 \omega_i}},$$

gdje je  $\beta_i$  veličina učinka testiranog polimorfizma u  $i$ -toj kohorti, a  $\omega_i = 1/SE_i^2$ , gdje je  $SE_i$  standardna greška u  $i$ -toj kohorti.

Testna  $Z$ -statistika za testirani polimorfizam računa se s pomoću formule

$$Z = \frac{\beta}{SE},$$

dok se značajnost testiranog polimorfizma u meta-analizi, odnosno pripadna  $P$ -vrijednost, računa upotrebom formule

$$P = 2\Phi(-|Z|).$$

Meta-analiza je uključila ukupno 708 ispitanika oboljelih od HT-a i 735 kontrola. Za najznačajnije genetske varijante iz meta-analize prikazani su dijagrami povezanosti pripadnih genomskih regija (engl. *regional association plot*) korištenjem računalnog softvera

LocusZoom (94) i dijagrami šumica (engl. *forest plot*) uporabom računalnog programa R (Foundation for Statistical Computing, Beč, Austrija).

### 3.2.9. Analiza genetskog rizičnog skora

Genetski rizični skor (GRS) za svakog ispitanika izračunat je težinskim zbrajanjem broja rizičnih alela triju polimorfizama (rs12944194, rs75201096, rs7919039) koji su pokazali povezanost s HT-om u meta-analizi na razini značajnosti  $P < 5 \times 10^{-5}$ . Pripadne težine za svaki polimorfizam bile su proporcionalne veličini učinka polimorfizma procijenjenoj u meta-analizi.

Analiza povezanosti između GRS-a i HT-a provedena je u sve tri kohorte zasebno, uporabom modela logističke regresije uz prilagodbu za dob i spol. Preciznije, korišten je model

$$\ln \frac{p}{1-p} = \alpha_0 + \alpha_1 C_1 + \alpha_2 C_2 + \beta GRS + \varepsilon, \quad (a)$$

gdje je  $p$  vjerojatnost da je status bolesti  $Y$  ( $Y = 0$  za kontrole i  $Y = 1$  za slučajeve) jednak 1, tj. vjerojatnost da ispitanik boluje od HT-a,  $\alpha_0$  je slobodni koeficijent,  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  su koeficijenti regresije za kovarijante  $C_1$  (dob) i  $C_2$  (spol),  $\beta$  je koeficijent regresije za  $GRS$ , a  $\varepsilon$  je vektor reziduala.

Dobiveni rezultati za sve tri kohorte su potom meta-analizirani korištenjem metode inverzne varijance sa stalnim učincima.

Također, procijenjena je i ukupna varijabilnost u HT-u objašnjena GRS-om. U tu svrhu, kreiran je i osnovni model logističke regresije koji uključuje samo spol i dob kao nezavisne varijable:

$$\ln \frac{p}{1-p} = \alpha_0 + \alpha_1 C_1 + \alpha_2 C_2 + \varepsilon. \quad (b)$$

Varijanca u HT-u objašnjena GRS-om, odnosno pseudo koeficijent  $R^2$  je zatim izračunat kao razlika između Nagelkerke-ovog pseudo koeficijenta  $R^2$  za model (a) i Nagelkerke-ovog pseudo koeficijenta  $R^2$  za model (b). Nagelkerke-ov  $R^2$  koeficijent računa se s pomoću formule

$$R^2 = \frac{R_{CS}^2}{\max(R_{CS}^2)},$$

gdje je  $R_{CS}^2$  Cox-Snell-ov pseudo koeficijent koji se računa kao

$$R_{CS}^2 = 1 - \left(\frac{L_0}{L_m}\right)^{\frac{2}{n}},$$

gdje je  $n$  veličina uzorka,  $L_0$  je vjerodostojnost nultog modela bez prediktora, dok je  $L_m$  vjerodostojnost testiranog modela (95).

Konačna varijanca objašnjena GRS-om je zatim procijenjena kao aritmetička sredina triju dobivenih varijanci ponderirana veličinama triju kohorti.

GRS kvartili izračunati su iz zajedničke distribucije GRS-a u tri kohorte. Prvi GRS kvartil je odabran kao referentna kategorija te je uspoređen udio ispitanika oboljelih od HT-a (tj. rizik od nastanka HT-a) između prvog GRS kvartila i ostalih kvartila uporabom modela logističke regresije prilagođenog za dob i spol. Ova analiza napravljena je zasebno u svakoj kohorti te su potom dobiveni rezultati za tri kohorte meta-analizirani korištenjem metode inverzne varijance sa stalnim učincima.

### **3.2.10. Evaluacija povezanosti *HLA* regije i HT-a**

S obzirom na dosad poznatu ulogu *HLA* regije u razvoju HT-a, ovu regiju smo detaljnije proučili. Odabrali smo sve genetske varijante koje se nalaze unutar *HLA* regije te smo detaljno pregledali rezultate analize povezanosti u početnoj skupini za odabrane varijante s ciljem evaluacije povezanosti *HLA* regije i HT-a.

### **3.2.11. Analiza rezultata prethodno objavljenih studija**

Odabrali smo devet genetskih varijanti čija je povezanost s HT-om otkrivena u prethodno objavljenim kandidatnim genetskim studijama, te smo provjerili njihovu povezanost s HT-om u našoj početnoj skupini izdvajanjem rezultata za odabrane varijante iz ukupnih rezultata cjelogenomske analize povezanosti u početnoj skupini.

Također, provjerili smo i rezultate analize povezanosti u našoj početnoj skupini za 118 genetskih varijanti, identificiranih putem prethodno objavljenih cjelogenomskih studija, koje su bile povezane s fenotipovima biološki sličnim HT-u (autoimuna bolest štitnjače, hipotireoza, zajednička pojava autoimune bolesti štitnjače i šećerne bolesti tipa 1, Gravesova bolest, TPOAt, TSH). Za sve odabrane genetske varijante usporedili smo njihove *P*-vrijednosti i smjerove učinaka u originalnim studijama s rezultatima u našoj početnoj skupini, te smo proveli binomni test smjera da bi procijenili značajnost udjela genetskih varijanti s učincima u istom smjeru.

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Rezultati cjelogenomske analize povezanosti HT-a u početnoj skupini

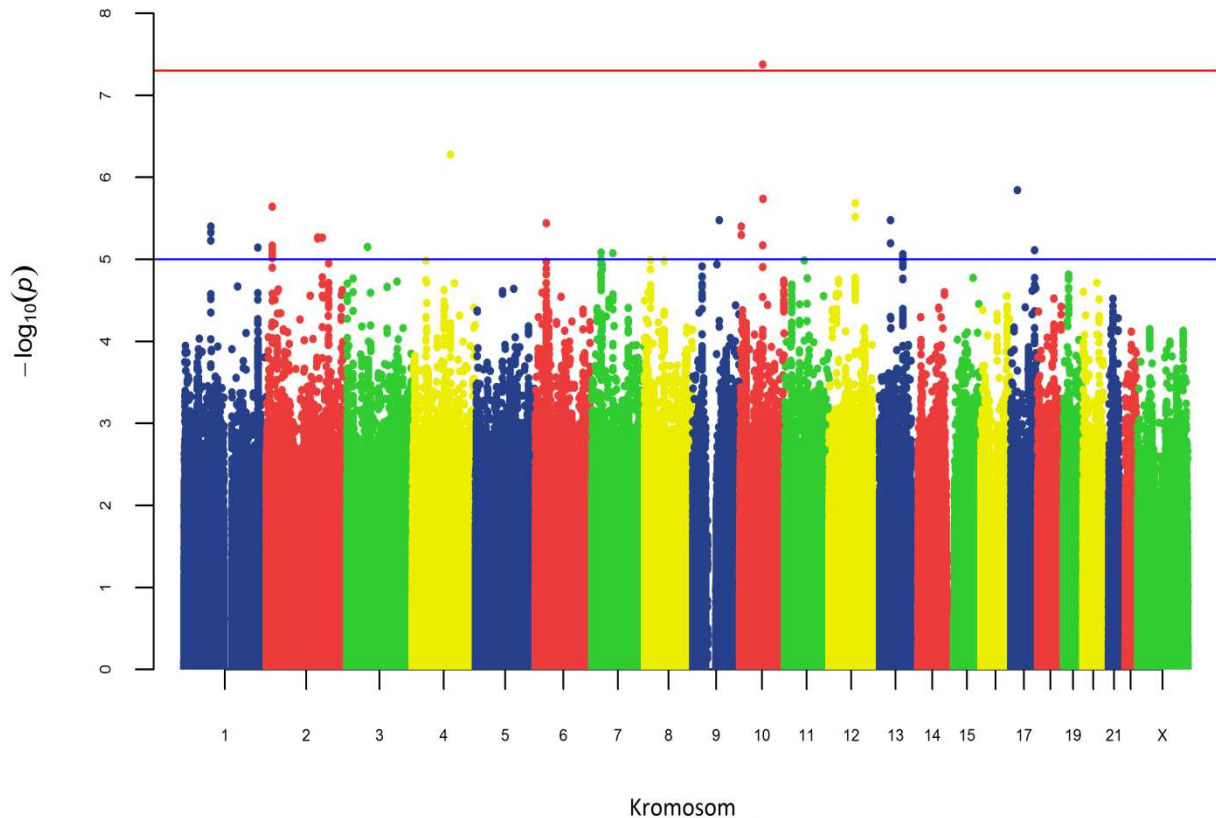
Cjelogenomskom analizom povezanosti HT-a u početnoj skupini identificirana je jedna genetska varijanta (mutacija s pogrešnim smislom rs72799515) na 10. kromosomu unutar *TET1* gena povezana s HT-om na cjelogenomskoj razini značajnosti ( $P=4.21 \times 10^{-8}$ ,  $\beta=0.365$ ,  $SE=0.066$  za alel A) (tablica 3). Također, otkrivena je i još jedna mutacija s pogrešnim smislom (rs4148254) na 4. kromosomu unutar *UGT8* gena povezana s HT-om na razini značajnosti blizu cjelogenomske ( $P=5.25 \times 10^{-7}$ ,  $\beta=0.365$ ,  $SE=0.072$  za alel C) (tablica 3). Obje identificirane genetske varijante imale su frekvenciju rjeđeg alela manju od 0.01 u skupini ispitanika oboljelih od HT-a. Također, otkriveno je i dodatnih 16 nezavisnih genetskih varijanti povezanih s HT-om na razini značajnosti  $P < 10^{-5}$  (tablica 3). Cjelokupni prikaz rezultata cjelogenomske analize povezanosti HT-a u početnoj skupini za sva 23 kromosoma nalazi se na Manhattan grafu (slika 14), dok se prikaz odnosa očekivanih i dobivenih P vrijednosti iz cjelogenomske analize povezanosti nalazi na kvantil-kvantil grafu (slika 15).

Na osnovi rezultata cjelogenomske analize povezanosti HT-a u početnoj skupini, odabrali smo 13 najznačajnijih nezavisnih genetskih varijanti za genotipizaciju i analizu povezanosti s HT-om u dvije replikacijske kohorte, kao što je ranije opisano.

#### 4.2. Rezultati meta-analize

Rezultati analize povezanosti HT-a u početnoj skupini i replikacijskim skupinama te rezultati meta-analize između početne skupine i dviju replikacijskih skupina za 13 odabranih genetskih varijanti prikazani su u tablici 3. Dvije najznačajnije genetske varijante iz cjelogenomske analize povezanosti HT-a u početnoj skupini, nisu pokazale povezanost s HT-om u replikacijskim skupinama (tablica 3). Od preostalih odabranih genetskih varijanti, nijedna nije dosegla povezanost s HT-om na cjelogenomskoj razini značajnosti u meta-analizi između početne skupine i dviju replikacijskih skupina (tablica 3). Od ukupno 13 odabranih genetskih varijanti, tri su pokazale povezanost s HT-om u meta-analizi na razini značajnosti  $P < 5 \times 10^{-5}$ : rs12944194 na 17. kromosomu, udaljen oko 206kb od *SDK2* gena ( $P=1.8 \times 10^{-6}$ ,  $\beta=-0.088$ ,  $SE=0.018$  za alel T), rs75201096 smješten na 9. kromosomu unutar *GNA14* gena ( $P=2.41 \times 10^{-5}$ ,  $\beta=-0.252$ ,  $SE=0.06$  za alel T) i rs791903 smješten na 6. kromosomu unutar *IP6K3* gena

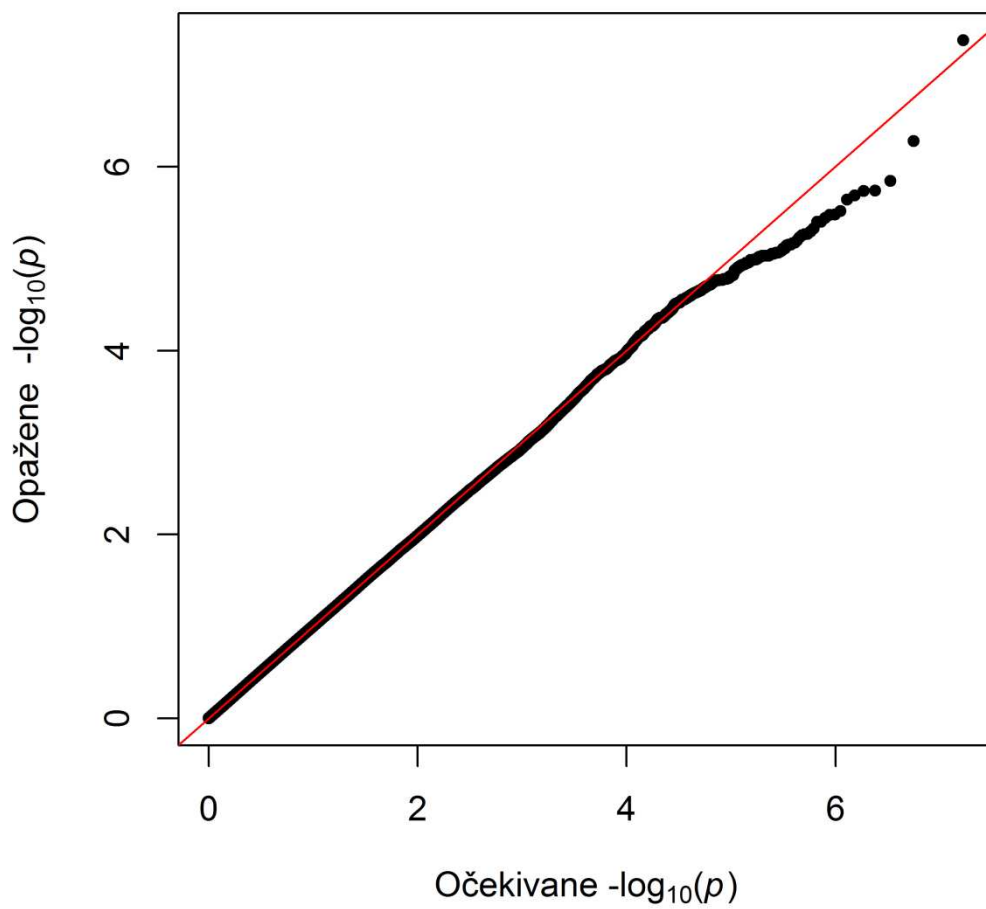
( $P=3.16 \times 10^{-5}$ ,  $\beta=0.07$ ,  $SE=0.017$  za alel G) (tablica 3). Dijagrami povezanosti pripadnih genomskih regija i dijagrami šumica za tri značajne genetske varijante identificirane u meta-analizi nalaze se redom na slikama 16, 17 i 18.



**Slika 14.** Manhattan graf cjelogenomske analize povezanosti HT-a.

Objašnjenje slike: Svaka točka predstavlja jedan polimorfizam, pri čemu x-os označava poziciju polimorfizma u genomu, a y-os negativni logaritam P vrijednosti iz cjelogenomske analize povezanosti polimorfizma i HT-a. Plava linija predstavlja granicu značajnosti  $P < 10^{-5}$  tj.  $-\log_{10}(P) > 5$ , dok crvena linija predstavlja cjelogenomsku granicu značajnosti ( $P < 5 \times 10^{-8}$  tj.  $-\log_{10}(P) > 7.3$ )





**Slika 15.** QQ graf (kvantil-kvantil graf) cjelogenomske analize povezanosti HT-a.

**Tablica 3.** Rezultati analize povezanosti u početnoj skupini i replikacijskim skupinama, te rezultati meta-analize za 18 genetskih varijanti koje su pokazale povezanost s HT-om na razini značajnosti  $P < 10^{-5}$  u početnoj skupini.

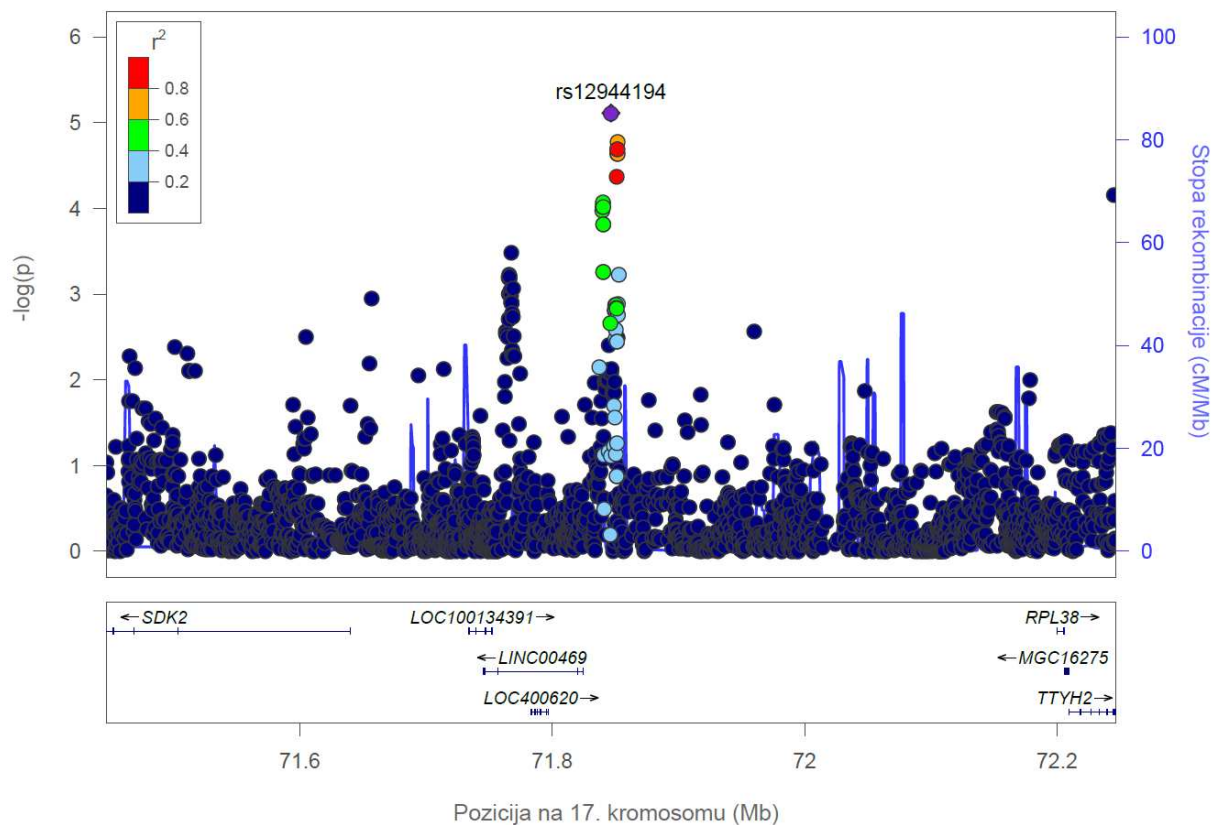
Chr	Pozicija	Polimorfizam	Gen/najbliži gen	Početna skupina						Replikacijska skupina (Osijek)						Replikacijska skupina (Split)						Meta-analiza					
				(N_slučajevi=405, N_kontrole=433)			(N_slučajevi=221, N_kontrole=184)			(N_slučajevi=82, N_kontrole=118)			(N_slučajevi=708, N_kontrole=735)			(N_slučajevi=82, N_kontrole=118)			(N_slučajevi=708, N_kontrole=735)			(N_slučajevi=82, N_kontrole=118)			(N_slučajevi=708, N_kontrole=735)		
				EA	OA	Gen	EA	OA	Gen	EA	OA	Gen	EA	OA	Gen	EA	OA	Gen	EA	OA	Gen	EA	OA	Gen	EA	OA	Gen
17	71846563	rs12944194	SDK2 (206 kb)	T	C	0,271	0,356	-0,105	0,023	7,73E-06	0,308	0,359	-0,058	0,037	0,1186	0,311	0,364	-0,063	0,050	0,2114	-0,088	0,018	1,80E-06				
9	80098900	rs75201096	GNA14	T	C	0,960	0,988	-0,351	0,075	3,31E-06	0,980	0,984	-0,030	0,121	0,8014	0,970	0,987	-0,181	0,169	0,2868	-0,252	0,060	2,41E-05				
6	33702645	rs791903	IP6K3	G	C	0,572	0,459	0,100	0,021	3,61E-06	0,534	0,511	0,020	0,034	0,5597	0,561	0,530	0,027	0,046	0,5603	0,070	0,017	3,16E-05				
4	115544713	rs4148254	UGT8	C	T	1,000	0,960	0,365	0,072	5,25E-07	0,971	0,965	0,048	0,092	0,6020	0,970	0,987	-0,117	0,170	0,4914	0,208	0,054	1,14E-04				
7	28636611	rs7789923	CREB5	G	C	0,867	0,927	-0,163	0,036	8,25E-06	0,896	0,902	-0,021	0,060	0,7227	0,896	0,894	0,003	0,077	0,9732	-0,107	0,029	2,04E-04				
12	79312976	rs1381882	SYT1	T	A	0,471	0,374	0,112	0,023	2,06E-06	0,419	0,405	-0,003	0,035	0,9414	0,384	0,424	-0,031	0,045	0,4934	0,060	0,018	8,44E-04				
1	81821601	rs78091045	ADH4L2	C	G	0,846	0,912	-0,158	0,034	3,97E-06	0,880	0,851	0,039	0,053	0,4573	0,866	0,881	-0,012	0,071	0,8629	-0,088	0,027	9,17E-04				
10	5642749	rs72781984	ASB13 (38 kb)	C	A	0,985	0,962	0,339	0,073	3,97E-06	0,973	0,967	0,022	0,103	0,8308	0,951	0,975	-0,105	0,130	0,4221	0,175	0,054	1,26E-03				
13	51642432	rs76295792	GUCY1B2	T	C	0,966	0,942	0,271	0,058	3,33E-06	0,952	0,967	-0,076	0,089	0,3931	0,970	0,962	-0,027	0,131	0,8379	0,144	0,045	1,52E-03				
10	70405541	rs72799515	TET1	A	G	0,995	0,949	0,365	0,066	4,21E-08	0,946	0,946	0,016	0,075	0,8293	0,915	0,958	-0,148	0,089	0,0996	0,128	0,043	3,16E-03				
2	18603773	rs16984968	NT5C1B (62 kb)	A	G	0,868	0,933	-0,168	0,035	2,28E-06	0,925	0,880	0,132	0,059	0,0262	0,921	0,903	0,044	0,086	0,6132	-0,074	0,029	9,02E-03				
13	89308630	rs1326443	LINC00433 (11 kb)	A	C	0,139	0,082	0,154	0,034	8,61E-06	0,113	0,136	-0,052	0,055	0,3418	0,085	0,131	-0,128	0,077	0,0976	0,068	0,027	1,27E-02				
7	64157197	rs13231070	ZNF107	A	T	0,627	0,718	-0,105	0,023	8,36E-06	0,719	0,652	0,072	0,037	0,0495	0,640	0,644	0,024	0,049	0,6323	-0,043	0,018	1,88E-02				
17	20444302	rs140811894 <sup>a</sup>	KRT16P3 (36 kb)	C	T	0,992	0,978	0,656	0,135	1,43E-06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
2	15579785	rs116321114 <sup>a</sup>	KCNJ3 (65 kb)	G	C	0,997	0,982	0,501	0,109	5,38E-06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
2	169806650	rs2389615 <sup>b</sup>	ABCB11	T	C	0,917	0,863	0,165	0,036	5,44E-06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
3	62760326	rs35310050 <sup>a</sup>	CADPS	T	A	0,991	0,974	0,447	0,099	7,05E-06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
1	224142393	rs113692271 <sup>b</sup>	FBXO28 (159 kb)	T	C	0,666	0,757	-0,117	0,026	7,16E-06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

Polimorfizmi su poredani prema P-vrijednosti iz meta-analize manjom od 5E-05 su osijetljivi.

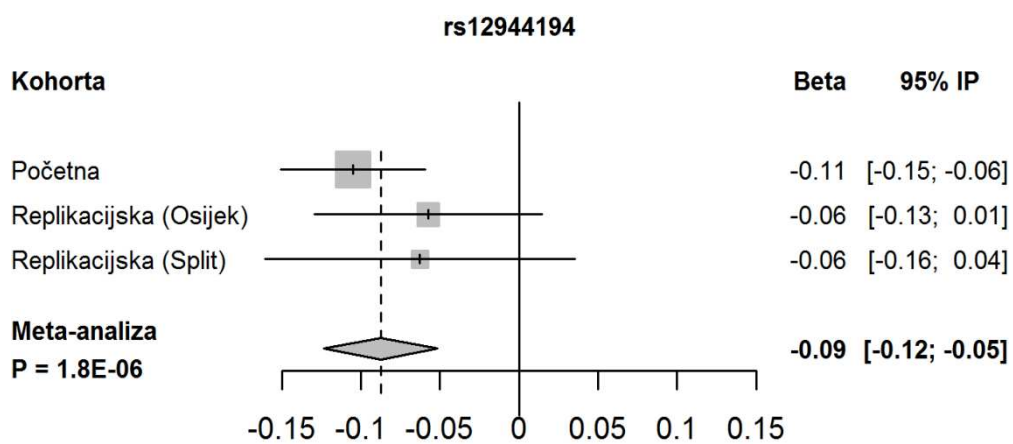
Chr-kromosom, EA-efektni alel, OA-drugi alel, EAF-frekvencija efektnog alela,  $\beta$ -veličina učinka polimorfizma, SE-standardna greška. Sve  $\beta$  (SE) vrijednosti izračunate su za efektni alel.

<sup>a</sup> Polimorfizam nije odabran za replikaciju jer frekvencija rjeđeg alela nije bila veća od 0,01 u obje grupe. <sup>b</sup> Polimorfizam nije odabran za replikaciju jer dizajn genotipizirajućih proba nije bio uspješan.

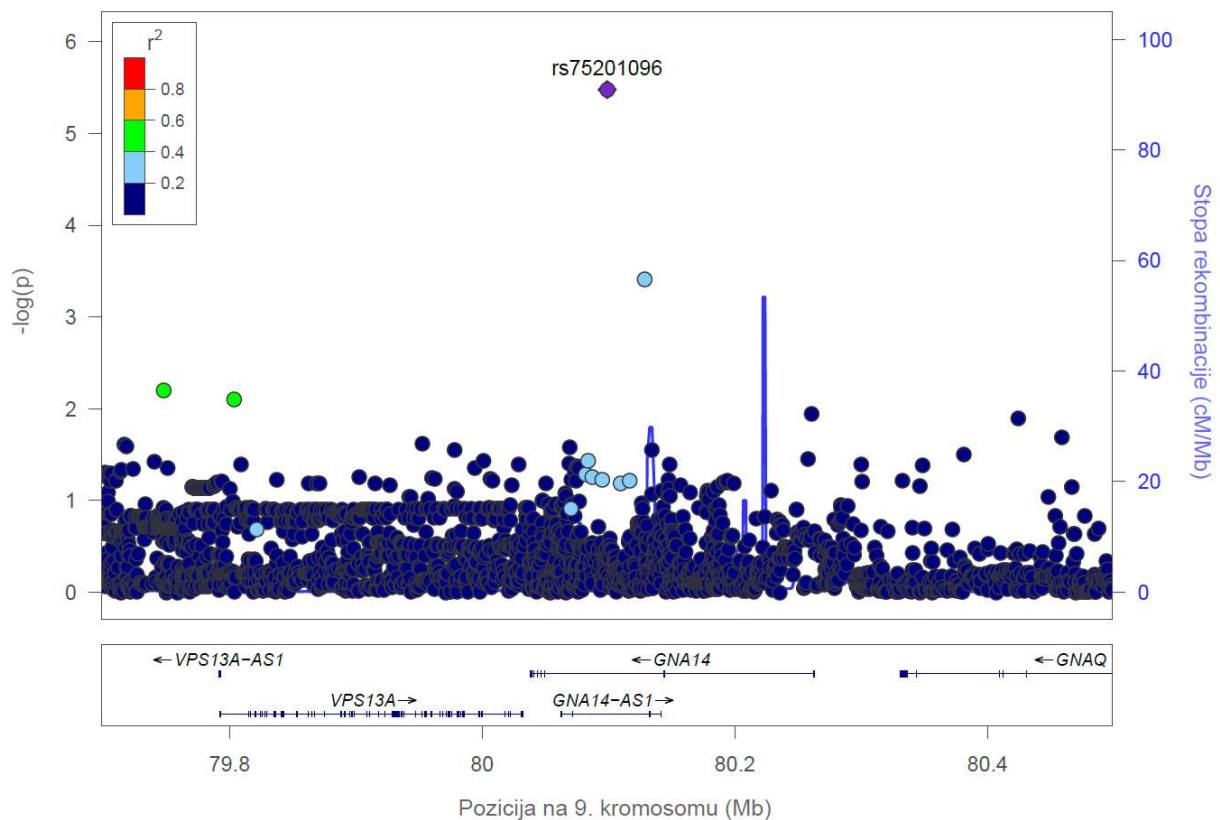
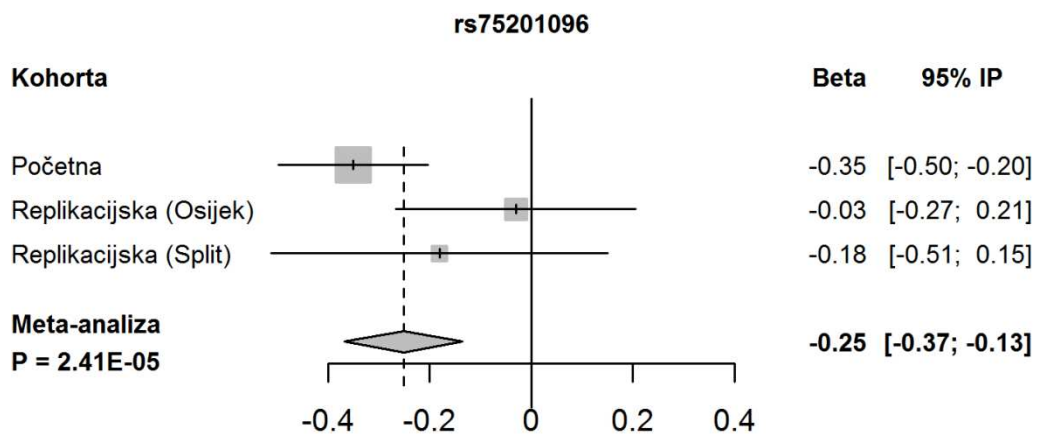
**A**



**B**

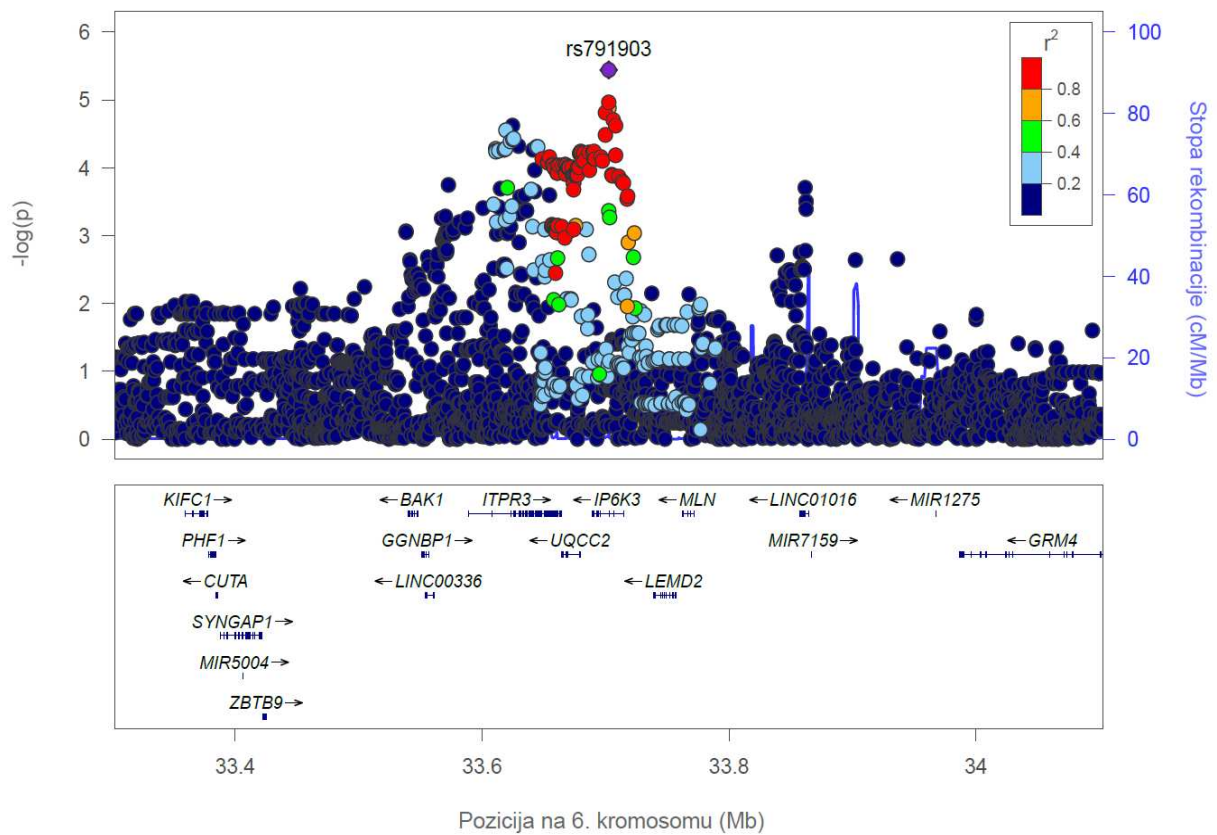


**Slika 16.** Dijagram povezanosti pripadne genomske regije (A) i dijagram šumica (B) za polimorfizam rs12944194.

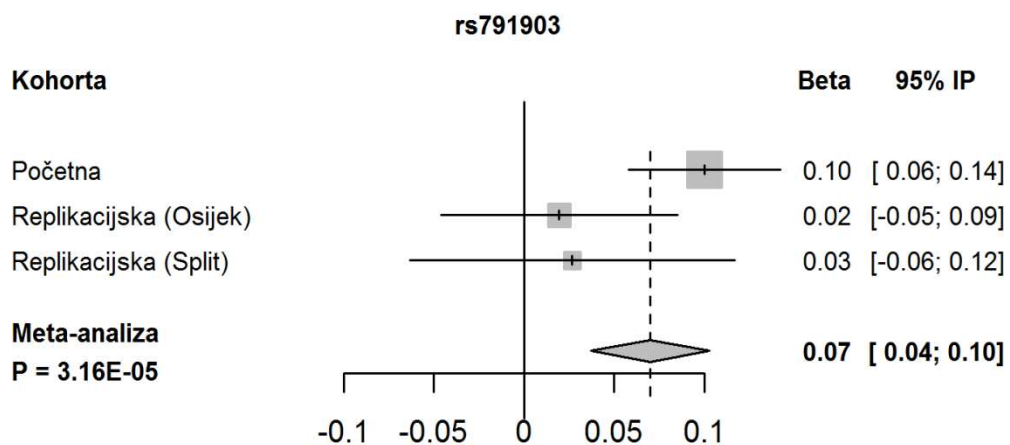
**A****B**

**Slika 17.** Dijagram povezanosti pripadne genomske regije (A) i dijagram šumica (B) za polimorfizam rs75201096.

**A**



**B**



**Slika 18.** Dijagram povezanosti pripadne genomske regije (A) i dijagram šumica (B) za polimorfizam rs791903.

### 4.3. Rezultati analize GRS-a

Uporabom rizičnih alela triju genetskih varijanti povezanih s HT-om u meta analizi (rs12944194, rs75201096, rs7919039) izračunali smo GRS za svakog ispitanika iz početne skupine i replikacijskih skupina. Meta-analiza povezanosti GRS-a i HT-a između početne kohorte i dviju replikacijskih kohorti pokazala je da je GRS statistički značajan prediktor za razvoj HT-a ( $\beta=4.584$ ,  $SE=0.686$ ,  $P=2.31 \times 10^{-11}$ ) kojim je objašnjeno 4.82% varijabilnosti u HT-u. Udio ispitanika oboljelih od HT-a povećavao se u svakom sljedećem GRS kvartilu, te su ispitanici iz četvrtog kvartila imali 2.76 puta veći rizik od HT-a u usporedbi s ispitanicima iz prvog kvartila (95% IP=1.97-3.88,  $P=4.36 \times 10^{-9}$ ) (tablica 4).

**Tablica 4.** Povezanost HT-a i kvartila genetskog rizičnog skora (GRS-a).

GRS kvartil (vrijednosti GRS-a)	Udio ispitanika oboljelih od HT-a (N HT_slučajevi/N svi)	OI (95% IP)	P
1 (<0,158)	40% (137/342)	referentni kvartil -	
2 (0,158-0,179)	43% (163/379)	1,08 (0,78-1,5)	0,6527
3 (0,179-0,245)	49% (135/275)	1,5 (1,05-2,15)	0,0276
4 (>0,245)	61% (273/447)	2,76 (1,97-3,88)	4,36E-09

OI-omjer izgleda, 95% IP- 95%-tni interval pouzdanosti omjera izgleda.

### 4.4. Evaluacija povezanosti *HLA* regije i HT-a

S obzirom da nismo utvrdili povezanost *HLA* regije s HT-om na cjelogenomskoj razini značajnosti ili razini značajnosti  $P < 10^{-5}$ , pregledali smo rezultate analize povezanosti u početnoj skupini za sve genetske varijante koje se nalaze unutar *HLA* regije s ciljem utvrđivanja snage povezanosti *HLA* regije i HT-a. Identificirana su četiri genetska signala unutar *HLA* regije povezana s HT-om na razini značajnosti  $P < 10^{-3}$  (tablica 5). Od četiri otkrivena signala, tri su smještena u neposrednoj blizini i nalaze se unutar *HLA* razreda I: rs2517534, udaljen oko 219 kb od *HLA-C* gena ( $P=3.59 \times 10^{-4}$ ,  $\beta=-0.088$ ,  $SE=0.025$  za alel A), rs9264584, smješten u neposrednoj blizini *HLA-C* gena ( $P=4.38 \times 10^{-4}$ ,  $\beta=-0.085$ ,  $SE=0.024$  za alel T) i rs9265259, smješten između *HLA-C* i *HLA-B* gena ( $P=5.17 \times 10^{-4}$ ,  $\beta=-0.164$ ,  $SE=0.047$  za

alel T) (tablica 5). Četvrti identificirani signal nalazi se unutar *HLA* razreda II, a najznačajnija genetska varijanta u ovom signalu jest rs3210176, smješten unutar *HLA-DQB1* gena ( $P=2.17 \times 10^{-4}$ ,  $\beta=-0.112$ ,  $SE=0.03$  za alel T) (tablica 5). Također, proveli smo i kondicionalnu analizu povezanosti koja je pokazala da su četiri identificirane *HLA* genetske varijante međusobno nezavisne (tablica 6). Dijagrami povezanosti pripadnih genomskih regija za četiri identificirane *HLA* genetske varijante nalaze se na slikama 19 i 20.

**Tablica 5.** Genetske varijante u *HLA* regiji povezane s HT-om na razini značajnosti  $P < 10^{-3}$ .

Regija	Pozicija	Polimorfizam	Gen/Najbliži geni	EA	OA	EAF	$\beta$	SE	P
<b>HLA razred I</b>	31017334	rs2517534	udaljen 4 kb od <i>HCG22</i> ; 219 kb od <i>HLA-C</i>	A	G	0,270	-0,088	0,025	3,59E-04
	31236034	rs9264584	udaljen manje od 1kb od <i>HLA-C</i>	T	C	0,327	-0,085	0,024	4,38E-04
	31291285	rs9265259	između <i>HLA-C</i> i <i>HLA-B</i>	T	C	0,059	-0,164	0,047	5,17E-04
<b>HLA razred II</b>	32627850	rs3210176	<i>HLA-DQB1</i>	T	C	0,789	-0,112	0,030	2,17E-04

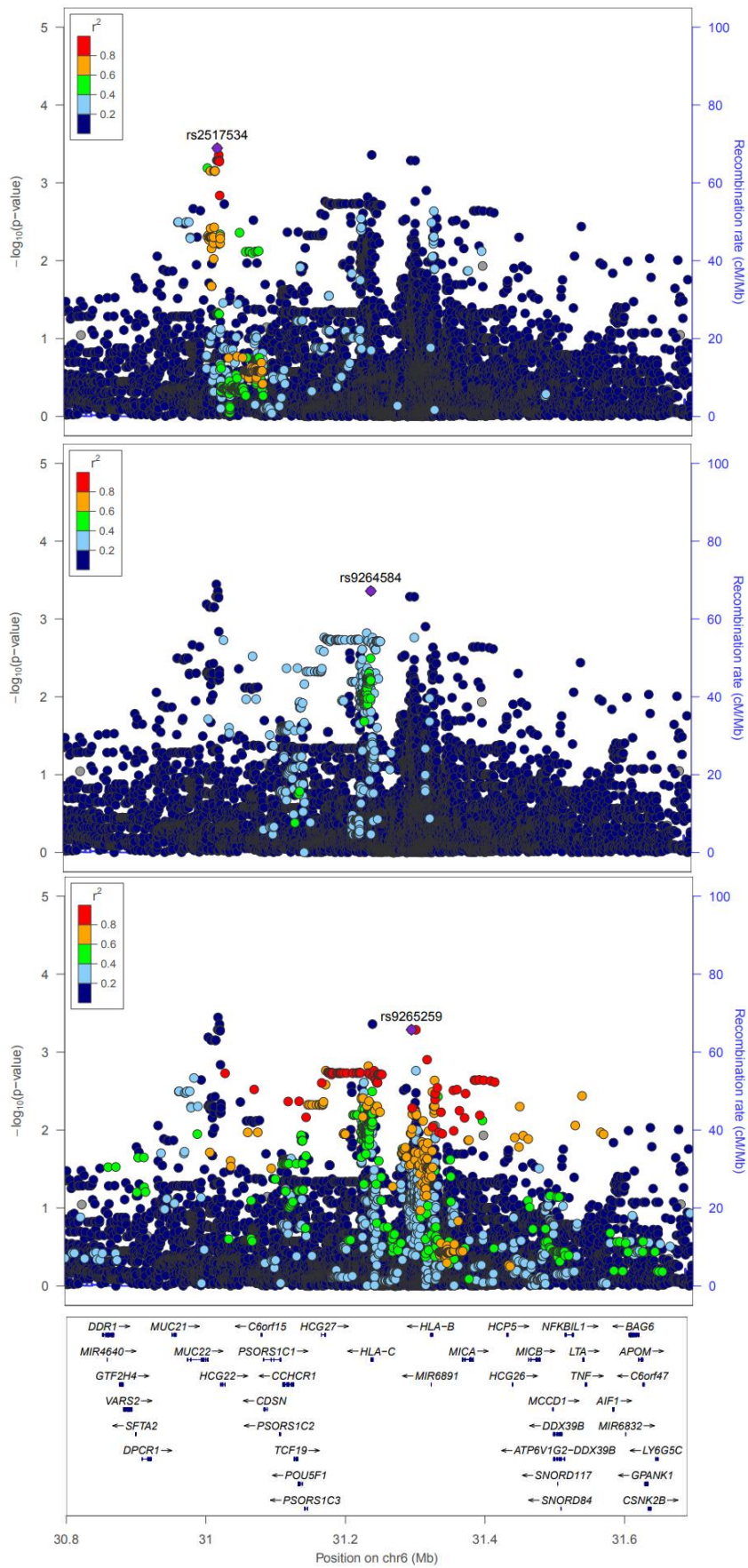
EA-efektni alel, OA-drugi alel, EAF-frekvencija efektnog alela,  $\beta$ - veličina efekta polimorfizma. SE-standardna greška.

**Tablica 6.** Rezultati analize povezanosti *HLA* genetskih varijanti nakon kondicioniranja za svaku od 4 genetske varijante.

Pozicija	Polimorfizam	EA	OA	EAF	Nekondicionirana analiza povezanosti			Analiza povezanosti kondicionirana za:							
					$\beta$	SE	P	rs2517534				rs9264584			
								$r^2$	$\beta$	SE	P	$r^2$	$\beta$	SE	P
31017334	rs2517534	A	G	0,27	-0,09	0,02	3,59E-04	/	/	/	/	0,07	-0,07	0,03	6,29E-03
31236034	rs9264584	T	C	0,327	-0,08	0,02	4,38E-04	0,07	-0,07	0,02	7,73E-03	/	/	/	/
31291285	rs9265259	T	C	0,059	-0,16	0,05	5,17E-04	0,147	-0,12	0,05	1,75E-02	0,204	-0,13	0,05	1,06E-02
32627850	rs3210176	T	C	0,789	-0,11	0,03	2,17E-04	0,004	-0,10	0,03	7,18E-04	0,028	-0,10	0,03	1,70E-03
Pozicija	Polimorfizam	EA	OA	EAF	Nekondicionirana analiza povezanosti			Analiza povezanosti kondicionirana za:							
					$\beta$	SE	P	rs9265259				rs3210176			
								$r^2$	$\beta$	SE	P	$r^2$	$\beta$	SE	P
31017334	rs2517534	A	G	0,27	-0,09	0,02	3,59E-04	0,147	-0,07	0,03	1,19E-02	0,004	-0,08	0,02	1,19E-03
31236034	rs9264584	T	C	0,327	-0,08	0,02	4,38E-04	0,204	-0,07	0,03	8,95E-03	0,028	-0,07	0,02	3,44E-03
31291285	rs9265259	T	C	0,059	-0,16	0,05	5,17E-04	/	/	/	/	0,023	-0,16	0,05	8,64E-04
32627850	rs3210176	T	C	0,789	-0,11	0,03	2,17E-04	0,028	-0,11	0,03	3,63E-04	/	/	/	/

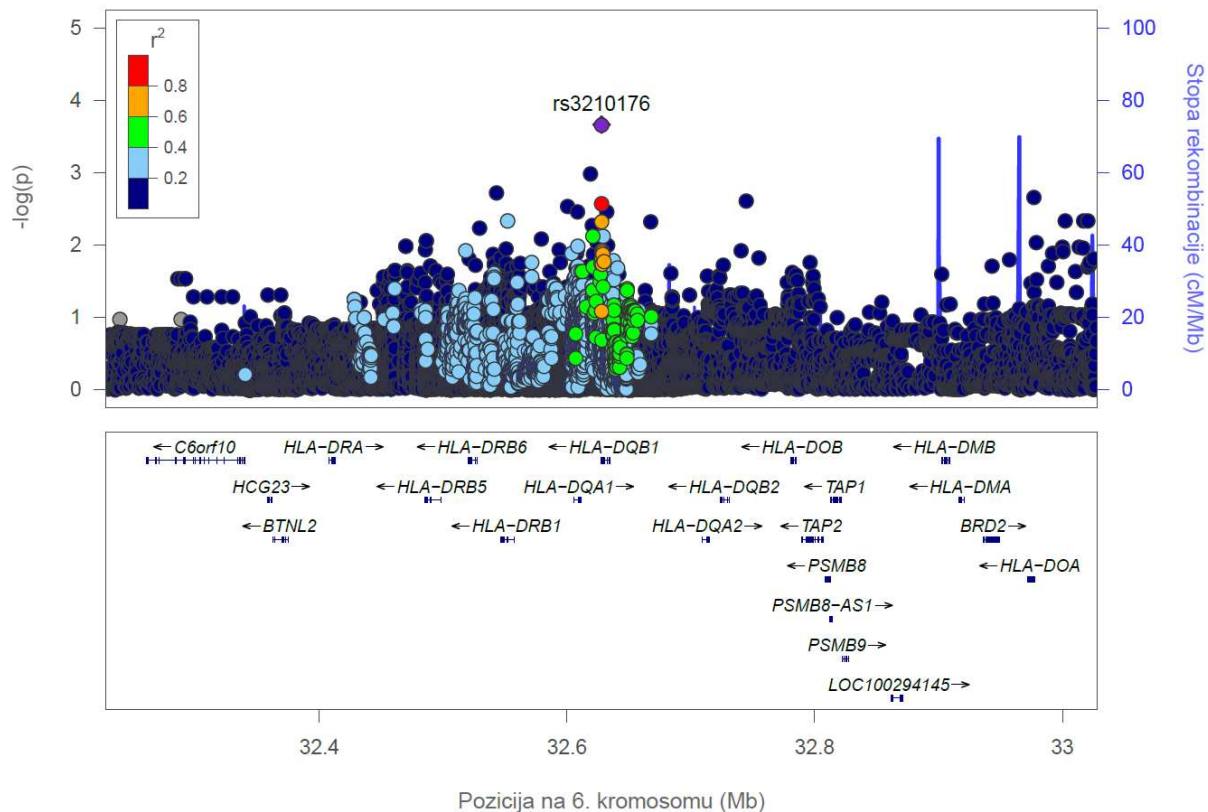
EA-efektni alel, OA-drugi alel, EAF-frekvencija efektnog alela,  $\beta$ - veličina efekta SNP-a, SE-standardna greška.

$r^2$ -mjera neravnoteže vezanosti.



Slika 19. Dijagrami povezanosti za tri otkrivena signala unutar *HLA* razreda I.





**Slika 20.** Dijagram povezanosti za otkriveni signal unutar *HLA* razreda II.

#### 4.5. Analiza rezultata prethodno objavljenih studija

Analiza rezultata cjelogenomske analize povezanosti HT-a u početnoj skupini za devet odabranih genetskih varijanti, čija je povezanost s HT-om otkrivena u prethodno objavljenim kandidatnim genetskim studijama, pokazala je da sedam od devet varijanti (78%) ima isti smjer učinka u ovom istraživanju kao u originalnim studijama (binomni test smjera:  $P=0.0898$ ) (tablica 7). Međutim, nijedna od devet odabranih genetskih varijanti nije replicirana u našoj studiji, tj. nije pokazala statistički značajnu povezanost s HT-om u početnoj skupini (tablica 7). Sve navedene kandidatne genetske studije, osim dvije (65, 73), nisu imale dovoljnu snagu i provedene su na uzorcima čije su veličine bile značajno manje od veličine uzorka ovog istraživanja.

Od 118 genetskih varijanti identificiranih putem prethodno objavljenih cjelogenomskih studija, koje su bile povezane s fenotipovima biološki sličnim HT-u, njih 88 (75%) imalo je isti

smjer učinka u našoj studiji kao i u originalnim studijama (binomni test smjera:  $P=4.28 \times 10^{-8}$ ) (tablica 8). Od 118 odabranih genetskih varijanti, dvije varijante su pokazale povezanost s HT-om u početnoj skupini ovog istraživanja na razini značajnosti  $P < 10^{-3}$ : rs965513, smješten u blizini *FOXE1* gena ( $P=2.14 \times 10^{-4}$ ,  $\beta=-0.082$ ,  $SE=0.022$  za alel A), koji je originalno bio povezan s hipotireozom, te rs2517532, smješten unutar *HLA* razreda I ( $P=5.16 \times 10^{-4}$ ,  $\beta=-0.086$ ,  $SE=0.025$  za alel A), koji je također bio povezan s hipotireozom (tablica 8). Također, deset genetskih varijanti pokazalo je povezanost s HT-om u početnoj skupini na razini značajnosti  $P < 0.05$  (tablica 8). Navedene genetske varijante smještene su u blizini ili unutar *ATXN2* gena (dvije nezavisne varijante), *9q22.3* regije, *VAV3*, *BACH2*, *TAP2*, *RAC2*, *RNASET2*, *ITPR3* i *HLA-A* gena (tablica 8).

**Tablica 7.** Usporedba rezultata originalnih studija za 9 polimorfizama povezanih s HT-om, koji su otkriveni putem kandidatnih genetskih studija, s rezultatima analize povezanosti HT-a u početnoj skupini ovog istraživanja.

Chr	Pozicija	Polimorfizam	PMID originalne studije	Originalni P	Veličina uzorka	Gen	EA	OA	EAF	$\beta$	SE	P	Smjer učinka
1	1143657	rs3753348	21592113	0,0387	107 slučajeva*	<i>GITR</i>	C	G	0,941	-0,059	0,054	0,2716	isti
2	204732714	rs231775 (A49G)	23661465	<0,00001	2295 slučajeva, 4521 kontrola	<i>CTLA-4</i>	A	G	0,634	-0,015	0,022	0,4933	isti
2	113590390	rs1143634 (+3953)	25310146	0,0099	115 slučajeva, 103 kontrole	<i>IL1B</i>	G	A	0,789	-0,011	0,028	0,6949	isti
2	113594867	rs16944 (-511)	25310146	0,0081	115 slučajeva, 103 kontrole	<i>IL1B</i>	A	G	0,358	0,019	0,023	0,4136	isti
6	52101739	rs763780	22816799	0,001	182 slučajeva, 224 kontrole	<i>IL17F</i>	T	C	0,952	-0,017	0,050	0,7366	isti
7	22766246	rs1800796 (572G)	21235536	0,031	108 slučajeva, 57 kontrola	<i>IL6</i>	G	C	0,935	0,013	0,044	0,7697	isti
12	48272895	rs2228570	25817800	0,009	44 slučajeva, 32 kontrole	<i>VDR-FokI</i>	A	G	0,366	0,011	0,032	0,7390	suprotan
15	101817727	rs28665122 (105G/A)	24471570	<5E-07	481 slučajeva, 516 kontrola	<i>SEPS1</i>	C	T	0,897	0,049	0,040	0,2249	suprotan
17	40465910	rs1053005	24081513	0,0091	250 slučajeva, 301 kontrola	<i>STAT3</i>	T	C	0,814	-0,043	0,028	0,1225	isti

Chr-kromosom, PMID- identifikacijski broj članka u bazi "Pubmed", Originalni P- P vrijednost u originalnoj studiji. EA-efektni alel, OA-drugi alel, EAF-frekvencija efektnog alela,  $\beta$ - veličina efekta polimorfizma, SE-standardna greška. Sve  $\beta$  (SE) vrijednosti izračunate su za efektni alel.

\*Ova studija je uspoređivala 58 slučajeva s HT-om koji su razvili hipotireozu i 49 slučajeva s HT-om u eutireozu.

**Tablica 8.** Usporedba rezultata originalnih studija s rezultatima analize povezanosti HT-a u početnoj skupini ovog istraživanja za 118 polimorfizama povezanih s fenotipovima biološki sličnima HT-u, koji su otkriveni putem cjelogenomskih studija.

Chr	Polimorfizam	PMID originalne studije	Fenotip	Veličina uzorka	Originalni P	Najbliži gen, regija	EA	OA	EAF	$\beta$	SE	P	Smjer učinka
1	2529097 rs2843403	22922229	AITD	2759 slučajeva, 9364 kontrola	5,63E-06	<i>MMEL1</i>	T	C	0,307	-0,045	0,023	0,0536	isti
2	12640741 rs1534422	22922229	AITD	2759 slučajeva, 9364 kontrola	1,76E-07	<i>TRIB2</i>	G	A	0,420	-0,006	0,022	0,7657	suprotan
3	188125120 rs13093110	22922229	AITD	2759 slučajeva, 9364 kontrola	3,69E-08	<i>LPP</i>	C	T	0,513	-0,004	0,021	0,8540	isti
6	90976768 rs72928038	22922229	AITD	2759 slučajeva, 9364 kontrola	1,23E-07	<i>BACH2</i>	G	A	0,857	-0,047	0,035	0,1878	isti
11	95311422 rs4409785	22922229	AITD	2759 slučajeva, 9364 kontrola	7,69E-08	<i>11q21</i>	T	C	0,805	-0,045	0,026	0,0869	isti
12	42869140 rs4768412	22922229	AITD	2759 slučajeva, 9364 kontrola	3,56E-06	<i>PRICKLE1</i>	C	T	0,586	-0,002	0,022	0,9092	isti
16	31185882 rs57348955	22922229	AITD	2759 slučajeva, 9364 kontrola	5,13E-08	<i>ITGAM</i>	G	A	0,572	0,005	0,024	0,8377	isti
1	108343087 rs7537605	25429627	HT	444 slučajeva, 1363 kontrola	1,24E-05	<i>VAV3</i>	G	A	0,660	-0,014	0,024	0,5440	isti
9	100556109 rs965513	21981779	hipotireoza	1580 slučajeva, 6669 kontrola	4,19E-09	<i>FOXE1</i>	A	G	0,331	-0,082	0,022	<b>2,14E-04</b>	isti
9	117222675 rs4979402	21981779	hipotireoza	1580 slučajeva, 6669 kontrola	1,23E-06	<i>DFNB31</i>	G	A	0,249	-0,022	0,026	0,3899	suprotan
9	100543880 rs1877432	21981779	hipotireoza	1580 slučajeva, 6669 kontrola	1,99E-06	<i>9q22.3</i>	G	A	0,632	-0,045	0,021	<b>0,0351</b>	isti
4	55478686 rs17827152	21981779	hipotireoza	1580 slučajeva, 6669 kontrola	3,20E-06	<i>4q12</i>	G	A	0,815	-0,038	0,029	0,1979	isti
3	72880470 rs17043990	21981779	hipotireoza	1580 slučajeva, 6669 kontrola	8,34E-06	<i>SHQ1</i>	T	C	0,998	0,139	0,227	0,5410	suprotan
8	128840276 rs4733792	21981779	hipotireoza	1580 slučajeva, 6669 kontrola	2,35E-04	<i>PVT1</i>	T	C	0,369	-0,030	0,022	0,1758	suprotan
18	57455061 rs4940904	21981779	hipotireoza	1580 slučajeva, 6669 kontrola	1,10E-04	<i>CCBE1</i>	C	T	0,612	-0,010	0,024	0,6800	suprotan
1	108366016 rs4915077	22493691	hipotireoza	3736 slučajeva, 35546 kontrola	7,50E-10	<i>VAV3</i>	T	C	0,904	-0,073	0,036	<b>0,0458</b>	isti
6	31018407 rs2517532	22493691	hipotireoza	3736 slučajeva, 35546 kontrola	1,30E-08	<i>HLA</i>	A	G	0,267	-0,086	0,025	<b>5,16E-04</b>	isti
6	32570400 rs2516049	22493691	hipotireoza	3736 slučajeva, 35546 kontrola	6,00E-07	<i>HLA</i>	T	C	0,836	-0,052	0,031	0,0981	isti
1	19755030 rs1472565	22493691	hipotireoza	3736 slučajeva, 35546 kontrola	6,30E-05	<i>CAPZB</i>	T	C	0,490	0,010	0,021	0,6257	suprotan
1	108336533 rs17020055	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	2,7E-22	<i>VAV3</i>	A	C	0,900	-0,025	0,036	0,4788	isti
1	114377568 rs2476601	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	2,1E-31	<i>PTPN22</i>	A	G	0,096	0,071	0,037	0,0545	isti
2	1407628 rs11675342	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	6,4E-14	<i>SNTG2</i>	C	T	0,541	-0,040	0,022	0,0677	isti
2	204738919 rs3087243	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	1,4E-15	<i>CTLA-4</i>	G	A	0,561	0,031	0,022	0,1468	isti
2	217628430 rs1861628	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	5,6E-9	<i>IGFBP5</i>	A	G	0,241	0,001	0,025	0,9538	suprotan
4	149631793 rs76342258	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	8,1E-18	<i>NR3C2</i>	G	T	0,845	0,014	0,029	0,6267	isti
5	76528022 rs1479567	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	1,4E-23	<i>PDE8B</i>	G	A	0,657	-0,014	0,022	0,5252	isti
6	32626492 rs9273370	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	4,5E-34	<i>HLA-DQA1</i>	G	A	0,411	-0,024	0,022	0,2651	isti
6	43805502 rs10223666	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	4,6E-10	<i>VEGFA</i>	G	C	0,269	-0,018	0,025	0,4685	isti
6	90975999 rs661713	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	1,5E-7	<i>BACH2</i>	G	A	0,374	-0,020	0,022	0,3568	isti

Chr	Pozicija	Polimorfizam	PMID originalne studije		Fenotip	Veličina uzorka	Originalni P	Najbliži gen, regija	EA	OA	EAF	$\beta$	SE	P	Smjer učinka
6	148514301	rs6914622	27182965	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	1,2E-14	<i>SAMD5</i>	G	T	0,698	-0,009	0,024	0,6971	isti
6	166047034	rs1079418	27182965	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	9,3E-12	<i>PDE10A</i>	A	G	0,684	0,009	0,023	0,7000	isti
8	32432949	rs2466075	27182965	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	5,9E-10	<i>NRG1</i>	A	G	0,515	0,014	0,022	0,5351	suprotan
10	64052337	rs10821973	27182965	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	4,1E-8	<i>RTKN2</i>	G	A	0,410	-0,002	0,022	0,9163	suprotan
10	101283330	rs10748781	27182965	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	1,4E-10	<i>GOT1</i>	C	A	0,411	0,003	0,021	0,9058	isti
12	56467587	rs7312770	27182965	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	8,0E-8	<i>RPS26</i>	C	T	0,432	0,020	0,022	0,3649	isti
12	111910219	rs10774625	27182965	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	1,4E-26	<i>ATXN2</i>	A	G	0,540	0,069	0,021	<b>0,0011</b>	isti
13	24774647	rs9511143	27182965	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	2,6E-8	<i>SPATA13</i>	C	T	0,314	0,014	0,025	0,5846	isti
19	7222832	rs7508679	27182965	27182965	hipotireoza	17558 slučajeva, 117083 kontrola	1,3E-7	<i>INSR</i>	T	C	0,434	0,000	0,022	0,9983	isti
6	31918860	rs1270942	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	4,65E-25	<i>CFB</i>	A	G	0,927	-0,047	0,045	0,2962	isti
6	32064726	rs1150752	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	2,27E-24	<i>TNXB</i>	T	C	0,932	-0,034	0,047	0,4722	isti
6	31568469	rs2857595	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	1,87E-23	<i>NCR3</i>	G	A	0,833	-0,006	0,030	0,8526	isti
6	31364707	rs2251396	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	9,87E-23	<i>MICA</i>	G	A	0,815	0,020	0,028	0,4878	suprotan
6	32798731	rs1015166	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	3,84E-22	<i>TAP2</i>	C	T	0,653	0,020	0,023	0,3799	suprotan
6	32363215	rs1980493	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	1,57E-20	<i>BTNL2</i>	T	C	0,882	-0,011	0,034	0,7512	isti
6	31448976	rs3099844	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	3,94E-20	<i>HCP5</i>	C	A	0,915	-0,057	0,041	0,1687	isti
1	114377568	rs2476601	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	7,35E-20	<i>PTPN22</i>	A	G	0,096	0,071	0,037	0,0545	isti
6	32172993	rs3131296	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	3,27E-18	<i>NOTCH4</i>	C	T	0,894	-0,056	0,037	0,1292	isti
6	31601843	rs3115663	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	8,72E-18	<i>BAT2</i>	T	C	0,851	-0,029	0,032	0,3630	isti
6	31778272	rs2227956	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	1,99E-15	<i>HSPA1L</i>	G	A	0,082	-0,059	0,040	0,1416	suprotan
6	30782002	rs886424	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	2,89E-14	<i>IER3</i>	C	T	0,923	-0,048	0,044	0,2742	isti
6	31101674	rs3130564	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	5,75E-13	<i>PSORS1C1</i>	C	T	0,882	-0,042	0,036	0,2394	isti
6	30829522	rs2844657	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	3,02E-12	<i>DDR1</i>	A	G	0,817	-0,037	0,029	0,2022	isti
1	114429461	rs2358994	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	1,56E-11	<i>BCL2L15</i>	G	A	0,835	-0,040	0,029	0,1682	isti
6	31515799	rs2071591	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	1,14E-10	<i>NFKB1L1</i>	G	A	0,725	-0,009	0,025	0,7244	isti
6	31540784	rs1041981	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	1,50E-10	<i>LTA</i>	C	A	0,721	-0,008	0,025	0,7365	isti
4	122314040	rs7679475	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	3,51E-10	<i>GPR103</i>	A	G	0,399	0,014	0,022	0,5381	isti
1	114243899	rs1111695	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	1,65E-08	<i>PHTF1</i>	C	A	0,400	-0,004	0,021	0,8610	suprotan
6	30078275	rs2523989	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	1,86E-08	<i>TRIM31</i>	C	T	0,880	-0,013	0,035	0,7091	isti
1	114080071	rs2153977	25936594	25936594	AITD i T1D	531 slučajeva, 1067 kontrola	4,18E-07	<i>MAG13</i>	C	T	0,683	-0,010	0,023	0,6747	isti

Chr	Pozicija	Polimorfizam	PMID	Fenotip	Veličina uzorka	Originalni P	Najbliži gen, regija	EA	OA	EAF	$\beta$	SE	P	Smjer učinka
			originalne studije											
1	114173410	rs1230666	24586183	TPOAt	20512 ispitanika	1,80E-08	MAGI3	A	G	0,122	0,027	0,034	0,4214	isti
6	33055605	rs9277555	24586183	TPOAt	20512 ispitanika	5,80E-07	HLA-DPB1	G	A	0,772	-0,005	0,026	0,8421	suprotan
1	8489302	rs301799	24586183	TPOAt	27287 ispitanika	2,50E-06	RERE	C	T	0,526	0,022	0,022	0,3101	isti
2	1407815	rs11675434	24586183	TPOAt	27287 ispitanika	1,50E-16	TPO	C	T	0,572	-0,036	0,022	0,1003	isti
6	31429927	rs3094228	24586183	TPOAt	27287 ispitanika	3,80E-07	HLA	T	C	0,783	-0,030	0,027	0,2653	isti
6	32787036	rs1894407	24586183	TPOAt	27287 ispitanika	1,20E-07	TAP2	C	A	0,631	0,044	0,022	<b>0,0478</b>	isti
6	90880393	rs10944479	24586183	TPOAt	27287 ispitanika	4,00E-08	BACH2	G	A	0,823	-0,082	0,032	<b>0,0117</b>	isti
12	112007756	rs653178	24586183	TPOAt	27287 ispitanika	9,90E-10	ATXN2	C	T	0,530	0,070	0,021	<b>0,0011</b>	isti
16	79700447	rs4889009	24586183	TPOAt	27287 ispitanika	3,30E-07	/	G	C	0,403	0,003	0,022	0,8793	isti
19	4768917	rs879564	24586183	TPOAt	27287 ispitanika	1,10E-07	MIR7-3HG	A	G	0,641	-0,001	0,023	0,9587	suprotan
20	51009757	rs4811340	24586183	TPOAt	27287 ispitanika	5,60E-07	/	G	C	0,673	0,032	0,023	0,1687	isti
6	33082308	rs733208	24722205	TPOAt	4238 ispitanika	4,20E-07	HLA-DPB2	G	A	0,834	-0,011	0,029	0,7044	isti
12	72749142	rs17111090	24722205	TPOAt	4238 ispitanika	3,80E-03	TRHDE	T	A	0,983	-0,050	0,084	0,5490	isti
1	157669278	rs3761959	21841780	GD	5530 slučajeva, 5026 kontrola	1,50E-13	FCRL3	C	T	0,592	-0,032	0,021	0,1323	isti
2	204721752	rs1024161	21841780	GD	5530 slučajeva, 5026 kontrola	2,34E-17	CTLA-4	T	C	0,395	-0,004	0,022	0,8583	suprotan
4	40303633	rs6832151	21841780	GD	5530 slučajeva, 5026 kontrola	1,08E-13	RHOH	G	T	0,268	0,023	0,024	0,3431	isti
6	31058178	rs4947296	21841780	GD	5530 slučajeva, 5026 kontrola	3,51E-51	MUC21	T	C	0,847	0,014	0,030	0,6364	suprotan
6	32428285	rs6903608	21841780	GD	5530 slučajeva, 5026 kontrola	5,12E-24	HLA-DR-DQ	C	T	0,453	-0,008	0,022	0,7378	suprotan
6	32663851	rs6457617	21841780	GD	5530 slučajeva, 5026 kontrola	7,38E-33	HLA-DR-DQ	C	T	0,423	0,000	0,023	0,9861	suprotan
6	33060118	rs2281388	21841780	GD	5530 slučajeva, 5026 kontrola	1,50E-65	HLA-DPB1	G	A	0,985	0,113	0,085	0,1820	suprotan
6	167383075	rs9355610	21841780	GD	5530 slučajeva, 5026 kontrola	6,85E-10	RNASET2	G	A	0,677	0,069	0,023	<b>0,0033</b>	isti
14	81451229	rs12101261	21841780	GD	5530 slučajeva, 5026 kontrola	6,64E-24	TSHR	C	T	0,761	-0,008	0,025	0,7336	isti
6	29935250	rs3893464	21900946	GD	1551 slučajeva, 3875 kontrola	1,88E-20	HLA-A	G	A	0,557	0,044	0,022	<b>0,0439</b>	isti
6	29973925	rs4313034	21900946	GD	1551 slučajeva, 3875 kontrola	1,51E-15	HLA-A	C	T	0,149	0,057	0,030	0,0568	suprotan
6	30537606	rs3132613	21900946	GD	1551 slučajeva, 3875 kontrola	1,43E-13	HLA-A	C	G	0,223	0,029	0,028	0,2949	isti
6	31002616	rs4248154	21900946	GD	1551 slučajeva, 3875 kontrola	1,06E-13	PSORS1C1/2	C	T	0,816	0,038	0,028	0,1718	isti
6	32337630	rs2273017	21900946	GD	1551 slučajeva, 3875 kontrola	2,12E-22	C6orf10	G	A	0,331	0,002	0,023	0,9394	suprotan
6	33618162	rs9394159	21900946	GD	1551 slučajeva, 3875 kontrola	3,89E-12	ITPR3	A	T	0,517	0,048	0,022	<b>0,0298</b>	isti
6	33817929	rs4713693	21900946	GD	1551 slučajeva, 3875 kontrola	6,60E-13	ITPR3	T	C	0,528	0,018	0,021	0,3932	isti
1	67627260	rs12041056	23612905	GD	9529 slučajeva, 9984 kontrola	0,0103	IL23R	C	T	0,652	0,000	0,023	0,9839	isti

Chr	Pozicija	Polimorfizam	PMID originalne studije		Fenotip	Veličina uzorka	Originalni P	Najbliži gen, regija	EA	OA	EAF	$\beta$	SE	P	Smjer učinka
1	160464911	rs1265883	23612905	GD	9529 slučajeva, 9984 kontrola	2,01E-18	SLAMF6	C	A	0,063	0,027	0,062	0,6680	isti	
6	90929301	rs9344996	23612905	GD	9529 slučajeva, 9984 kontrola	1,90E-05	BACH2a	T	C	0,882	-0,006	0,032	0,8516	isti	
8	134087450	rs4301434	23612905	GD	9529 slučajeva, 9984 kontrola	4,57E-07	TG	A	G	0,600	-0,035	0,022	0,1087	isti	
8	134145512	rs2294025	23612905	GD	9529 slučajeva, 9984 kontrola	8,09E-09	TG	G	A	0,553	-0,028	0,022	0,1998	isti	
8	134185668	rs4736437	23612905	GD	9529 slučajeva, 9984 kontrola	1,14E-08	WISP1	T	G	0,523	-0,012	0,021	0,5615	isti	
9	136131322	rs8176746	23612905	GD	9529 slučajeva, 9984 kontrola	4,00E-06	ABOa	G	T	0,869	0,036	0,031	0,2456	isti	
14	98488007	rs1456988	23612905	GD	9529 slučajeva, 9984 kontrola	5,43E-09	/	G	T	0,245	-0,021	0,025	0,3842	isti	
15	31665443	rs4779520	23612905	GD	9529 slučajeva, 9984 kontrola	3,55E-05	KLF13	C	T	0,449	0,002	0,023	0,9282	isti	
22	37581485	rs229527	23612905	GD	9529 slučajeva, 9984 kontrola	4,85E-20	C1QTNF6	C	A	0,591	-0,014	0,022	0,5166	isti	
22	37635055	rs2284038	23612905	GD	9529 slučajeva, 9984 kontrola	6,40E-08	RAC2	A	G	0,668	0,068	0,022	<b>0,0025</b>	isti	
1	61620496	rs334699	23408906	TSH	26420 ispitanika	5,40E-12	NFIA	A	G	0,034	0,014	0,059	0,8160	suprotan	
2	217625523	rs13015993	23408906	TSH	26420 ispitanika	3,24E-15	IGFBP5	G	A	0,242	0,001	0,025	0,9522	suprotan	
4	149669506	rs10032216	23408906	TSH	26420 ispitanika	9,28E-16	NR3C2	T	C	0,838	0,010	0,029	0,7221	isti	
5	76530349	rs6885099	23408906	TSH	26420 ispitanika	1,95E-56	PDE8B	A	G	0,646	-0,011	0,022	0,6341	isti	
6	43811762	rs9472138	23408906	TSH	26420 ispitanika	6,72E-16	VEGFA	C	T	0,745	0,018	0,025	0,4747	isti	
6	43904780	rs11755845	23408906	TSH	26420 ispitanika	1,68E-10	VEGFA	C	T	0,736	0,007	0,025	0,7609	isti	
6	148521292	rs9497965	23408906	TSH	26420 ispitanika	2,25E-08	SASH1	C	T	0,612	-0,015	0,023	0,5085	isti	
6	166046483	rs753760	23408906	TSH	26420 ispitanika	1,21E-24	PDE10A	C	G	0,683	0,009	0,023	0,6856	isti	
8	32416274	rs7825175	23408906	TSH	26420 ispitanika	2,94E-09	NRG1	G	A	0,777	-0,029	0,025	0,2503	suprotan	
9	4267209	rs1571583	23408906	TSH	26420 ispitanika	2,55E-08	GLIS3	A	G	0,28	0,021	0,024	0,3775	isti	
9	136139265	rs657152	23408906	TSH	26420 ispitanika	4,11E-10	ABO	C	A	0,575	0,009	0,022	0,6927	suprotan	
11	45227567	rs17723470	23408906	TSH	26420 ispitanika	8,83E-11	PRDM11	C	T	0,779	-0,008	0,025	0,7600	suprotan	
14	36574018	rs1537424	23408906	TSH	26420 ispitanika	1,17E-08	MBIP	C	T	0,436	0,021	0,022	0,3456	isti	
14	93595591	rs11624776	23408906	TSH	26420 ispitanika	1,79E-09	ITPK1	A	C	0,633	0,034	0,022	0,1224	suprotan	
15	49746364	rs10519227	23408906	TSH	26420 ispitanika	1,02E-11	FGF7	T	A	0,749	0,019	0,024	0,4401	isti	
15	89119104	rs17776563	23408906	TSH	26420 ispitanika	2,89E-10	MIR1179	G	A	0,644	0,016	0,023	0,4927	isti	
16	79749353	rs3813582	23408906	TSH	26420 ispitanika	8,45E-18	MAF	T	C	0,67	-0,021	0,022	0,3454	suprotan	
17	70127536	rs9915657	23408906	TSH	26420 ispitanika	7,53E-13	SOX9	T	C	0,609	0,004	0,022	0,8568	suprotan	
19	7223848	rs4804416	23408906	TSH	26420 ispitanika	3,16E-10	INSR	T	G	0,55	-0,011	0,021	0,5911	isti	

AITD-autoimuna bolest štitnjače, AITD i T1D-zajednička pojava autoimune bolesti štitnjače i šećerne bolesti tipa 1, GD-Gravesova bolest. Chr-kromosom, PMID- identifikacijski broj članka u bazi "Pubmed", Originalni P- P-vrijednost u originalnoj studiji, EA-efektni alel, OA-drugi alel. EAF-frekvencija efektnog alela,  $\beta$ - veličina efekta polimorfizma, SE- standardna greška. Sve  $\beta$  (SE) vrijednosti izračunate su za efektni alel. Svi polimorfizmi nominalno povezani s HT-om (P<0,05) u početnoj skupini ovog istraživanja su osjenčeni.

## **5. RASPRAVA**

Ovim istraživanjem pokušala se rasvijetliti genetska podloga HT-a, provođenjem prve cjelogenomske analize povezanosti fokusirane isključivo na HT. U istraživanje je ukupno uključeno 1443 ispitanika, od čega 708 ispitanika oboljelih od HT-a i 735 kontrola. Najvažniji rezultat ovog istraživanja jest identifikacija triju novih genetskih varijanti povezanih s razvojem HT-a.

### 5.1. *SDK2* genomska regija

Najznačajnija genetska varijanta otkrivena u ovom istraživanju jest rs12944194. Utvrđeno je da je učestaliji alel ovog polimorfizma, odnosno alel C, povezan s povećanim rizikom nastanka HT-a. Otkrivena genetska varijanta nalazi se na 17. kromosomu i udaljena je 206 kb od *SDK2* gena (pomoćna stanična adhezivna molekula 2, engl. *sidekick cell adhesion molecule 2*) koji kodira protein koji je član imunoglobulinske superobitelji. Dodatno, otkriven je još jedan nezavisni genetski signal povezan s HT-om, doduše na nešto nižoj razini značajnosti (rs2619967,  $P=3.23 \times 10^{-4}$ ), u istoj genomskoj regiji, udaljen 79 kb od najznačajnijeg polimorfizma (slika 16A). Postojanje dvaju nezavisnih signala u istoj genomskoj regiji u neposrednoj blizini ukazuje na snažnu povezanost ove genomske regije s HT-om. Također, dosad je već otkriveno nekoliko zanimljivih povezanosti s poremećenom funkcijom štitnjače u ovoj regiji. Nedavno provedena velika meta-analiza cjelogenomskih studija povezanosti za koncentracije TSH i  $fT_4$  u serumu, pokazala je da je rjeđi alel C polimorfizma rs9915657 značajno povezan s povećanom koncentracijom TSH ( $P=7.53 \times 10^{-13}$ ) (96). Ovaj polimorfizam udaljen je otprilike 1 Mb od najznačajnijeg polimorfizma u našoj studiji. Također, jedna cjelogenomska studija povezanosti otkrila je dva polimorfizma (rs12795 i rs12938083) povezana s razvojem hipotireoze ( $P=3 \times 10^{-3}$ ,  $P=9.15 \times 10^{-4}$ , redom). Otkriveni polimorfizmi udaljeni su 566 kb, odnosno 576 kb od najznačajnijeg polimorfizma u našoj studiji (97). Postojanje prethodno utvrđenih genetskih varijanti povezanih s koncentracijom TSH i hipotireozom u istoj, iako široj, genomskoj regiji unutar koje se nalazi i identificirana genetska varijanta povezana s HT-om u ovom istraživanju, upućuje na važnost ove genomske regije u regulaciji funkcije štitnjače. Dodatno, polimorfizam rs12451840 koji je također smješten u ovoj genomskoj regiji, 39 kb od najznačajnijeg polimorfizma, povezan je s glikozilacijom ljudskog IgG-a (98). Ovo je također zanimljivo opažanje s obzirom da su oba



protutijela štitnjače koja su prisutna u HT-u (TPOAt i TgAt) uglavnom IgG klase, a nedavno je pokazano da su razine glikozilacije TgAt-a veće u ispitanika oboljelih od HT-a u usporedbi sa zdravim ispitanicima (99).

Ostale genetske varijante unutar ove regije dosad su bile povezane i s drugim različitim fenotipovima i bolestima, poput paničnog poremećaja (100), fibroze jetre kod pacijenata s ko-infekcijom virusom HIV-a i hepatitis C virusom (101), odgovora na terapiju zileutonom u bolesnika s astmom (102), spirometrijskim mjerama protoka zraka (103), čimbenicima homeostaze glukoze (104) te fenotipova koji se mogu povezati s psihijatrijskim stanjima kao što su razina provodljivosti kože i elektrodermalne aktivnosti (105).

## 5.2. *GNA14* genomska regija

Drugi najznačajniji rezultat ovog istraživanja jest pronalazak intronske nekodirajuće varijante rs75201096 unutar *GNA14* gena (gvanin vezujući protein alfa-14, engl. *guanine nucleotide-binding protein alpha-14*) na 9. kromosomu. Genetske varijante unutar ove genomske regije povezane su s koncentracijom cirkulirajućeg citokina eotaksina i glikozilacijom IgG-a (98, 106). Oba fenotipa biološki su povezana s HT-om, jer citokini imaju izrazito bitnu ulogu u patogenezi autoimunih bolesti štitnjače, dok je glikozilacija IgG-a, kao što je ranije spomenuto, povezana s protutijelima štitnjače koja su prisutna u većini bolesnika s HT-om (106). Također, specifična RAMPAGE (RNA anotacija i mapiranje promotora za analizu genske ekspresije, engl. *RNA Annotation and Mapping of Promoters for the Analysis of Gene Expression*) razina ekspresije transkripta za *GNA14* gen najveća je upravo u štitnjači (107, 108).

Međutim, animalne studije i cjelogenomske studije povezanosti upućuju na još jedan zanimljivi gen unutar ove regije, *GNAQ* gen (gvanin vezujuća proteinska podjedinica alfa ( $G\alpha_q$ ), engl. *guanine nucleotide-binding protein subunit alpha*). Ovaj gen udaljen je 232 kb od polimorfizma rs75201096, a uključen je u biološki put za sintezu hormona štitnjače (109). Jedna animalna studija pokazala je da nedostatak  $G\alpha_q/G\alpha_{11}$  u miševa dovodi do poremećene strukture folikularnih stanica i smanjenog izlučivanja hormona štitnjače, a polovica testiranih miševa razvila je hipotireozu u roku od nekoliko mjeseci nakon rođenja (110). Dodatno,

cjelogenomska analiza povezanosti provedena na otoku Sardiniji na uzorku od 4300 ispitanika otkrila je povezanost između koncentracije TSH i polimorfizma rs10512065 koji se nalazi unutar *GNAQ* gena ( $P=2.0 \times 10^{-4}$ ) (111).

Iz svega navedenog, vidljivo je da trenutno postoje dokazi koji upućuju na uključenost ove genomske regije u regulaciju funkcije štitnjače i autoimunog procesa koji se odvija u HT-u. Međutim, potrebno je dublje mapiranje ove regije i provođenje funkcionalnih studija da bi se utvrdili uzročni polimorfizmi i geni iz ove regije koji sudjeluju u patogenezi HT-a.

Ostale genetske varijante unutar ove regije dosad su bile povezane s Alzheimerovom bolesti i dobi u kojoj je dijagnosticirana bolest (112), morfologijom lica (113), 28-dnevnim mortalitetom u bolesnika liječenih od sepse (114), životnim vijekom roditelja (115) te odgovorom na terapiju amfetaminima (116).

### **5.3. *IP6K3* genomska regija**

Treći polimorfizam otkriven u ovom istraživanju jest intronska varijanta rs791903 smještena unutar *IP6K3* gena (inozitol heksafosfatna 3 kinaza, engl. *inositol hexaphosphate kinase 3*). Ovaj gen pretvara inozitol heksakisfosfat (InsP6) u difosfoinozitol pentakisfosfat (InsP7), a nalazi se na 6. kromosomu u blizini glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) (117). Uporabom javno dostupne genotipsko-fenotipske pretražujuće baze podataka „Phenoscaner“ (118), utvrdili smo da je otkriveni polimorfizam rs791903, osim s HT-om, također povezan s još jednom autoimunom bolešću, reumatoidnim artritismom (119). Reumatoidni artritis je najučestalija autoimuna bolest koja se udružuje s HT-om, te se pojavljuje u otprilike 4% bolesnika s HT-om, što upućuje na moguću zajedničku patogenezu dviju bolesti (120, 121), koja bi dijelom mogla biti objašnjena i ovim polimorfizmom. Također, zanimljivo je da su dva polimorfizma (rs4713693 i rs9394159), udaljena 115 kb odnosno 84 kb od polimorfizma rs79190, pokazala povezanost s Gravesovom bolesti na cjelogenomskoj razini značajnosti, u studiji provedenoj na velikom uzorku bolesnika s Gravesovom bolesti iz Japana (122). Gravesova bolest je također autoimuna bolest štitnjače, pa iako postoje razlike u genetskoj strukturi između HT-a i Gravesove bolesti, smatra se da je dio genetske pozadine jednak za obje bolesti (28). Nije

zgorega napomenuti da smo u ovom istraživanju odabrali poznate polimorfizme povezane s Gravesovom bolesti te smo provjerili njihovu povezanost s HT-om u našoj početnoj skupini. Od 27 testiranih polimorfizma, 4 su pokazala povezanost s HT-om na razini značajnosti  $P < 0.05$ , a značajan udio polimorfizama (njih 20 tj. 74%) imao je isti smjer učinka kao i u originalnim studijama (binomni test smjera:  $P = 0.0096$ ) (tablica 8). Ovaj rezultat upravo podupire hipotezu o zajedničkoj genetskoj pozadini HT-a i Gravesove bolesti, te podastire dodatne dokaze o mogućoj uključenosti ove genomske regije u razvoju HT-a.

Osim *IP6K3* gena, još jedan gen u neposrednoj blizini pokazuje dobru predispoziciju prema uključenosti u regulaciju funkcije štitnjače. Riječ je o *ITPR3* genu koji se nalazi 38 kb od polimorfizma rs791903 i kodira receptor inozitol 1,4,5 trifosfata, koji je drugi glasnik u procesu otpuštanja unutarstaničnog kalcija. Zajedno s ranije opisanom *GNAQ* genom, *ITPR3* je također uključen u biološki put za sintezu hormona štitnjače (109), što predočava dodatan dokaz o mogućoj uključenosti genomske regije otkrivenih u ovom istraživanju u nastanak HT-a.

Ostale genetske varijante unutar ove regije dosad su bile povezane s koncentracijom fosfora u serumu (123), Chronovom bolesti (124), tumorom zametnih stanica testisa (125, 126), shizofrenijom (127, 128), brojem trombocita (129), hematološkim parametrima (130) i kroničnom limfocitnom leukemijom (131, 132).

#### **5.4. Genetski rizični skor**

Ova studija također je dodatno analizirala snagu koju kumulativni učinak rizičnih alela triju identificiranih polimorfizama (rs12944194, rs75201096, rs7919039) može imati na razvoj HT-a. U tu svrhu, uporabom rizičnih alela triju polimorfizama, izračunat je genetski rizični skor (GRS) za svakog ispitanika iz početne skupine i replikacijskih skupina. Analiza povezanosti između GRS-a i HT-a pokazala je da je GRS statistički značajan prediktor HT-a koji objašnjava gotovo 5% ukupne varijabilnosti u HT-u. S obzirom da je procijenjeno da sve dosad otkrivene genetske varijante objašnjavaju otprilike 5.5% ukupne varijabilnosti u HT-u (59), možemo zaključiti da genetske varijante otkrivene u ovom istraživanju značajno doprinose poboljšanju trenutnog znanja o genetskoj pozadini HT-a. Također, utvrđeno je da ispitanici iz

gornjeg GRS kvartila imaju gotovo tri puta veće izgleda za razvoj HT-a u usporedbi s ispitanicima iz donjeg GRS kvartila. Ovi rezultati pokazuju da konstruirani GRS, odnosno novi polimorfizmi identificirani u ovom istraživanju, imaju dobar klinički potencijal za predikciju rizika od nastanka HT-a u skupinama uključenima u ovo istraživanje.

## 5.5. HLA genomska regija

Uloga *HLA* lokusa u etiologiji HT-a utvrđena je već odavno, najvećim dijelom putem kandidatnih genetskih studija. Za specifične markere *HLA* razreda II, kao što su *HLA-DR3* (*HLA-DRB1\*03*), *HLA-DR4* (*HLA-DRB1\*04*) i *HLA-DQB1*, utvrđeno je da su povezani s povećanim rizikom za razvoj HT-a u europskoj populaciji (62-64). Također, za određene markere *HLA* razreda I, kao što su *HLA-A* (*HLA-A\*02:07*) i *HLA-B* (*B\*46:01*), pokazano je da su povezani s HT-om u japanskoj populaciji te u populacijama kineske i korejske djece (60, 61, 133). Dodatno, u nedavno objavljenom preglednom članku zaključeno je da je povezanost *HLA* razreda I i HT-a poprilično složena, gdje najmanje četiri alela kontroliraju predodređenost za HT (*HLA-A\*02:07*, *B\*35:01*, *B\*40:02*, *B\*40:06*), odnosno otprilike 58% bolesnika s HT-om ima kopiju barem jednog od četiri alela iz *HLA* razreda I (134). Mi u ovom istraživanju nismo pronašli genetske varijante unutar *HLA* regije povezane s HT-om na cjelogenomskoj razini značajnosti, slično kao što povezanost na toj razini značajnosti nije pronađena ni u studiji koja je istraživala povezanost *HLA* regije i HT-a, a provedena je u Japanu na uzorku slične veličine (444 bolesnika s HT-om i 481 kontrola) (61). Stoga smo odlučili evaluirati povezanost kompletne *HLA* regije s HT-om u početnoj skupini te smo pronašli tri nezavisna signala unutar *HLA* razreda I te jedan signal unutar *HLA* razreda II na razini značajnosti  $P < 10^{-3}$ .

Sva tri otkrivena lokusa unutar *HLA* razreda I smještena su relativno blizu, unutar bloka veličine 274 kb koji sadrži *HLA-B* i *HLA-C* gene (slika 19). Kao što je ranije spomenuto, *HLA-B* je povezan s HT-om u japanskoj populaciji te u populacijama kineske i korejske djece (60, 61, 133). Međutim, još važnije opažanje jest da je najznačajniji polimorfizam *HLA* razreda I koji je otkriven u ovom istraživanju (rs2517534,  $P = 3.59 \times 10^{-4}$ ) u potpunom LD-u s polimorfizmom za kojeg je ranije pokazano da sudjeluje u razvoju hipotireoze (rs2517532) (76).

Najznačajniji polimorfizam unutar *HLA* razreda II (rs3210176) smješten je unutar *HLA-DQB1* lokusa, međutim signal povezanosti obuhvaća više gena uključujući i *HLA-DRB1*, najpoznatiji *HLA* lokus povezan s HT-om (slika 20). *HLA-DQB1* lokus prethodno je bio snažno povezan s HT-om (*HLA-DQB1\*0301*, zabilježen kao *HLA-DQw7*) i smatra se imunogenetičkim markerom bolesti (64). Također, zanimljivo je i da su dva polimorfizma (rs3129720 i rs9273370), smještena u neposrednoj blizini *HLA-DQB1* lokusa, pokazala povezanost s hipotireozom u dvije cjelogenomske studije povezanosti (76, 77).

Dublje mapiranje *HLA* regije ključno je za dodatno rasvjetljenje povezanosti ove regije s HT-om. Općenito, rezultati ovog istraživanja sugeriraju više lokusa, iz *HLA* razreda I i *HLA* razreda II, koji bi mogli biti uključeni u patogenezu HT-a, iako ova studija nije imala dovoljnu snagu za potvrdu povezanosti tih lokusa s HT-om na cjelogenomskoj razini značajnosti. S druge strane, ovo istraživanje također sugerira da, iako varijante unutar *HLA* regije imaju ulogu u razvoju HT-a, njihova uloga možda nije značajna u tolikoj mjeri kao što je slučaj s Gravesovom bolesti ili nekim drugim autoimunim bolestima.

## 5.6. Genomske regije iz prethodno objavljenih studija

Dodatna svrha ovog istraživanja bila je provjera povezanosti između HT-a i poznatih kandidatnih genetskih varijanti koje su bile povezane s HT-om putem kandidatnih genetskih studija ili s fenotipovima povezanim s funkcijom štitnjače putem cjelogenomskih studija.

Odabrali smo devet poznatih genetskih varijanti (izvan *HLA* regije), čija je povezanost s HT-om otkrivena u prethodno objavljenim kandidatnim genetskim studijama, te smo provjerili njihovu povezanost s HT-om u našoj početnoj skupini (tablica 7). Nijedna od odabranih varijanti nije pokazala povezanost s HT-om u ovom istraživanju. Ovaj rezultat nije neočekivan, s obzirom da su sve navedene genetske varijante, osim *CTLA-4* i *SEPS1* lokusa, otkrivene u izrazito malim uzorcima bez replikacije rezultata u nezavisnoj skupini. Svejedno, sedam od devet promatranih varijanti (78%) imalo je isti smjer učinka u ovom istraživanju kao u originalnim studijama. Povezanost *CTLA-4* lokusa i HT-a sugerirana je velikom meta-analizom kandidatnih genetskih studija, dok je povezanost *SEPS1* lokusa s HT-om otkrivena u portugalskoj populaciji i replicirana u kineskoj populaciji (65, 73, 74). Iako su oba gena

biološki vjerodostojni kandidati za povezanost s HT-om, u ovom istraživanju te povezanosti nisu replicirane. Dodatnim pregledom polimorfizama analiziranih u ovom istraživanju, utvrđeno je da se unutar *CTLA-4* i *SEPS1* gena nalazilo samo pet, odnosno jedanaest analiziranih polimorfizama, što upućuje na mogućnost da pokrivenost ovih gena polimorfizmima dostupnim za analizu nije bila dostatna za otkrivanje njihove povezanosti s HT-om. S druge strane, cjelogenomske studije povezanosti još trebaju evaluirati ulogu *CTLA-4* i *SEPS1* gena u razvoju HT-a, s obzirom da je dosad provedeno samo nekoliko cjelogenomskih studija koje su analizirale bolesnike s HT-om, ali u kombinaciji s Gravesovom bolesti ili drugim autoimunim bolestima (78-81). Samo jedna od navedenih studija je pronašla znakovitu povezanost varijante unutar *CTLA-4* gena s HT-om ( $P=0.0032$ ) (78), dok ostale studije nisu utvrdile povezanost ovih lokusa s HT-om (79-81), stoga trenutno nije moguće donijeti konačne zaključke o povezanosti ovih gena s HT-om.

Također, provjerili smo i rezultate analize povezanosti u našoj početnoj skupini za 118 genetskih varijanti, identificiranih putem prethodno objavljenih cjelogenomskih studija, koje su bile povezane s fenotipovima biološki sličnima HT-u (autoimuna bolest štitnjače, hipotireoza, zajednička pojava autoimune bolesti štitnjače i šećerne bolesti tipa 1, Gravesova bolest, TPOAt, TSH). Utvrđeno je da značajan udio odabranih varijanti (75%,  $P=4.28 \times 10^{-8}$ ) ima isti smjer učinka u ovom istraživanju kao i u originalnim studijama. Od 118 odabranih genetskih varijanti, dvije varijante su pokazale povezanost s HT-om na razini značajnosti  $P < 10^{-3}$ , a deset varijanti je pokazalo povezanost s HT-om na razini značajnosti  $P < 0.05$  (tablica 8).

Najznačajnija pronađena varijanta jest rs965513 ( $P=2.14 \times 10^{-4}$ ), smješten u blizini *FOXE1* gena. Ovaj polimorfizam je u originalnoj cjelogenomskoj studiji bio povezan s hipotireozom, nakon čega je odabran za dodatnu analizu povezanosti s 886 različitih kliničkih fenotipova izvučenih iz tzv. ICD kodova ispitanika (kodovi međunarodne klasifikacije bolesti, engl. *International Classification of Diseases*) (75). Dodatna analiza ovog polimorfizma utvrdila je njegovu znakovitu povezanost s HT-om ( $P=2.5 \times 10^{-4}$ ), te su autori navedene studije, imajući u vidu činjenicu da je HT najčešći uzrok hipotireoze, zaključili da je povezanost ovog polimorfizma s hipotireozom najvjerojatnije posljedica specifične povezanosti s HT-om (75). S obzirom da su u ovo istraživanje uključeni bolesnici s HT-om koji su razvili hipotireozu kao i eutireoidni bolesnici s HT-om, replikacija *FOXE1* polimorfizma u ovom istraživanju potvrđuje

originalnu hipotezu te predstavlja snažan dokaz o uključenosti *FOXE1* gena u patogenezu HT-a.

Druga varijanta povezana s HT-om jest rs2517532 ( $P=5.16 \times 10^{-4}$ ), smješten unutar *HLA* razreda I. Ovaj polimorfizam je također originalno bio povezan s hipotireozom (76), a pripada najznačajnijem *HLA* signalu otkrivenom u ovom istraživanju, koji je već ranije opisan. Ova regija povezana je s cijelim nizom autoimunih bolesti, što je u kombinaciji s hipotireozom, također čini biološki vjerodostojnim kandidatom za povezanost s HT-om.

Od deset varijanti za koje je utvrđena povezanost s HT-om na razini značajnosti  $P < 0.05$ , tri su otprije bile povezane s hipotireozom, četiri s Gravesovom bolesti, a tri s povišenim TPOAt. Također, značajan udio svih odabranih varijanti otprije povezanih s hipotireozom (73%,  $P=0.0081$ ), Gravesovom bolesti (75%,  $P=0.0096$ ), i TPOAt (83%,  $p=0.0193$ ) ima isti smjer učinka u početnoj skupini ovog istraživanja kao i u originalnim studijama što upućuje na zajedničku genetsku pozadinu HT-a i ovih fenotipova. Deset varijanti povezanih s HT-om na razini značajnosti  $P < 0.05$  smješteno je u blizini ili unutar *ATXN2* gena (dvije nezavisne varijante), *9q22.3* regije, *VAV3*, *BACH2*, *TAP2*, *RAC2*, *RNASET2*, *ITPR3* i *HLA-A* gena. Genomske regije kojima pripadaju navedeni geni potencijalno bi također mogle imati važnu ulogu u nastanku HT-a, te bi svakako trebale biti uključene u buduća istraživanja genetske pozadine HT-a.

## 5.7. Ograničenja i prednosti studije

U usporedbi s velikim cjelogenomskim studijama povezanosti koje se trenutno provode u polju humane genetike, ova studija je imala relativno malen uzorak, što je onemogućilo identifikaciju genetskih varijanti povezanih s HT-om na cjelogenomskoj razini značajnosti. Ova činjenica posebno je vidljiva u replikaciji dvaju poznatih lokusa za hipotireozu (*FOXE1* i *HLA* razred I), koji su otkriveni na razini značajnosti  $P < 10^{-3}$  što upućuje na činjenicu da je za identifikaciju ovih lokusa na cjelogenomskoj razini značajnosti potreban veći uzorak. Ova studija imala je snagu od 80% za otkrivanje polimorfizama s frekvencijom rizičnog alela od 0.35 i veličinom učinka od 0.16 na cjelogenomskoj razini značajnosti, tj. moguć je bio pronalazak isključivo polimorfizama s velikim učinkom. Ipak, pronalazak znakovitih

povezanosti između *FOXE1* i *HLA* razred I polimorfizama s HT-om služi kao pozitivna kontrola i potvrđuje da je ovo istraživanje dobro dizajnirano i provedeno. Također, činjenica da značajan udio polimorfizama otprije povezanih s fenotipovima biološki sličnim HT-u (75%) ima isti smjer učinka u ovom istraživanju kao i u originalnim studijama upućuje na činjenicu da postoji još lokusa povezanih s HT-om, ali veličina uzorka ove studije nije bila dostatna za njihovu identifikaciju. Kohorta ispitanika oboljelih od HT-a uspostavljena u ovom istraživanju pruža izvrstan resurs za buduće meta-analize, koje bi trebale biti sljedeći logičan korak u istraživanju genetske pozadine HT-a. Također, daljnje studije trebale bi se fokusirati na dublje mapiranje novih genomskih regija otkrivenih u ovom istraživanju s ciljem potvrde ovih rezultata i otkrivanja uzročnih genetskih varijanti.

S druge strane, mnogo je pozitivnih aspekata ovog istraživanja. Najveća prednost leži u činjenici da u ovom istraživanju nisu analizirani ispitanici čija je dijagnoza postavljena na temelju elektronskih baza podataka ili samoprocjene, već su ispitanici prikupljeni na klinici, gdje su liječnici specijalisti nuklearne medicine postavili dijagnozu bolesti i proveli strogu procjenu statusa bolesnika prije uključivanja u studiju. Osim toga, kontrole su također pažljivo odabrane te su iz kontrolne skupine isključeni svi ispitanici s mogućim autoimunim poremećajem ili oštećenom funkcijom štitnjače. S opisanim dizajnom studije smanjila se mogućnost dobivanja lažno pozitivnih rezultata i dodatno povećala značajnost dobivenih rezultata. Također, bitno je napomenuti da je ovo prva cjelogenomska studija povezanosti u svijetu koja je analizirala klinički dijagnosticirane bolesnike s HT-om i kontrole, što daje dodatnu težinu ovom istraživanju. Ostale prednosti ovog istraživanja uključuju provođenje stroge kontrole kvalitete svih uzoraka i genotipova i provođenje imputacije genotipova čime se uvelike povećao broj analiziranih polimorfizama, a samim time i snaga studije te vjerojatnost pronalaska genetskih varijanti povezanih s bolešću. Također, svi ispitanici uključeni u studiju imali su isto podrijetlo, čime je izbjegnuto problem populacijske stratifikacije, što je dodatno umanjilo mogućnost dobivanja lažno pozitivnih rezultata.



## **6. ZAKLJUČCI**

1. Glavni rezultat ovog istraživanja jest pronalazak triju novih genetskih varijanti povezanih s Hashimotovim tireoiditisom (HT): rs12944194 u blizini *SDK2* gena, rs75201096 unutar *GNA14* gena i rs791903 unutar *IP6K3* gena. Sva tri otkrivena lokusa po prvi put su povezana s nastankom HT-a, a genomske regije oko navedenih lokusa uključene su u regulaciju funkcije štitnjače i razvoj različitih autoimunih bolesti.
2. Genetski rizični skor (GRS) izračunat s pomoću tri novootkrivena polimorfizma, statistički je značajan prediktor HT-a i objašnjava gotovo 5% ukupne varijabilnosti u HT-u. Ispitanici iz gornjeg GRS kvartila imaju gotovo tri puta veće izgleda za razvoj HT-a u usporedbi s ispitanicima iz donjeg GRS kvartila ( $P=4.36 \times 10^{-9}$ ), što pokazuje da novootkriveni polimorfizmi imaju dobar klinički potencijal za predikciju rizika od nastanka bolesti u skupinama uključenima u ovo istraživanje.
3. Unutar *HLA* regije nije bilo genetskih varijanti povezanih s HT-om na razini značajnosti  $P < 10^{-5}$ , no otkrivena su četiri nezavisna lokusa povezana s HT-om na razini značajnosti  $P < 0.001$  u početnoj skupini ovog istraživanja. Tri otkrivena lokusa (rs2517534, rs9264584, rs9265259) nalaze se unutar *HLA* razreda I, u blizini *HLA-B* i *HLA-C* gena, dok se četvrti lokus (rs3210176) nalazi unutar *HLA* razreda II, u *HLA-DQB1* genu.
4. Provedenom analizom povezanosti između HT-a i 118 genetskih varijanti identificiranih u prethodno objavljenim cjelogenomskim studijama, koje su bile povezane s fenotipovima biološki sličnima HT-u, utvrđeno je da značajan udio varijanti otprije povezanih s Gravesovom bolesti (75%,  $P=0.0096$ ), hipotireozom (73%,  $P=0.0081$ ) i TPOAt (83%,  $p=0.0193$ ) ima isti smjer učinka u početnoj skupini ovog istraživanja kao i u originalnim studijama. Ovaj rezultat sugerira postojanje zajedničke genetske pozadine između HT-a i Gravesove bolesti, hipotireoze te TPOAt-a.
5. Od 118 genetskih varijanti otprije povezanih s fenotipovima biološki sličnima HT-u, u početnoj skupini ovog istraživanja otkrivene su dvije varijante povezane s HT-om na razini značajnosti  $P < 0.001$ : rs965513, smješten u blizini *FOXE1* gena, te rs2517532,

smješten unutar *HLA* razreda I. Obje otkrivene varijante ranije su bile povezane s hipotireozom.

6. Ovo istraživanje predstavlja temelj za daljnja genetska istraživanja HT-a, koja bi trebala uključivati veći broj ispitanika i meta-analizu s drugim svjetskim kohortama. Štoviše, buduća istraživanja trebala bi se fokusirati na funkcionalne studije i dublje mapiranje genomskih regija otkrivenih u ovom istraživanju (uključujući i *HLA*) s ciljem otkrivanja novih uzročnih genetskih varijanti.

## **7. LITERATURA**

1. Bumber Ž, Katić V, Nikšić-Ivančić M, Pegan B, Petric V, Šprem N. Otorinolaringologija. Zagreb: Naklada Ljevak; 2004.
2. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
3. Jalšovec D. Sustavna i topografska anatomija čovjeka. Zagreb: Školska knjiga; 2005.
4. Krmpotic-Nemanic J, Marušić A. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada; 2007.
5. Benvenga S, Tuccari, G., Ieni, A., Vita, R. Thyroid Gland: Anatomy and Physiology: Elsevier; 2018.
6. Braun EM, Windisch G, Wolf G, Hausleitner L, Anderhuber F. The pyramidal lobe: clinical anatomy and its importance in thyroid surgery. Surg Radiol Anat 2007;29:21-7.
7. Bradamante Ž, Kostović-Knežević L. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 2005.
8. Di Jeso B, Arvan P. Thyroglobulin From Molecular and Cellular Biology to Clinical Endocrinology. Endocr Rev 2016;37:2-36.
9. Djelmiš J, Kusić Z, Ivanišević, M. Bolesti štitnjače u trudnoći. Zagreb: Laserplus; 2004.
10. Damjanov I, Jukić S, Nola M. Patologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
11. Solter M. Bolesti štitnjače - klinička tireoidologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2007.
12. De Leo S, Lee SY, Braverman LE. Hyperthyroidism. Lancet 2016;388:906-18.
13. Laurberg P, Cerqueira C, Ovesen L, i sur. Iodine intake as a determinant of thyroid disorders in populations. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2010;24:13-27.
14. Kusić Z. Hipotireoza. Zagreb: Medicinska naklada; 2014.
15. Caturegli P, De Remigis A, Rose NR. Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria. Autoimmun Rev 2014;13:391-7.
16. Krohn K, Paschke R. Clinical review 133: Progress in understanding the etiology of thyroid autonomy. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:3336-45.
17. Cooper DS, Biondi B. Subclinical thyroid disease. Lancet 2012;379:1142-54.
18. Chaker L, Bianco AC, Jonklaas J, Peeters RP. Hypothyroidism. Lancet 2017;390:1550-62.
19. Garmendia Madariaga A, Santos Palacios S, Guillen-Grima F, Galofre JC. The incidence and prevalence of thyroid dysfunction in Europe: a meta-analysis. J Clin Endocrinol Metab 2014;99:923-31.

20. Bougma K, Aboud FE, Harding KB, Marquis GS. Iodine and mental development of children 5 years old and under: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients* 2013;5:1384-416.
21. Bath SC, Steer CD, Golding J, Emmett P, Rayman MP. Effect of inadequate iodine status in UK pregnant women on cognitive outcomes in their children: results from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). *Lancet* 2013;382:331-7.
22. Caldwell KL, Pan Y, Mortensen ME, Makhmudov A, Merrill L, Moye J. Iodine status in pregnant women in the National Children's Study and in U.S. women (15-44 years), National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2010. *Thyroid* 2013;23:927-37.
23. Kusic Z, Novosel SA, Dabelic N, i sur. Croatia has reached iodine sufficiency. *J Endocrinol Invest* 2003;26:738-42.
24. Dayan CM, Daniels GH. Chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med* 1996;335:99-107.
25. Zaletel K, Gaberscek S. Hashimoto's Thyroiditis: From Genes to the Disease. *Curr Genomics* 2011;12:576-88.
26. Weetman AP. The immunopathogenesis of chronic autoimmune thyroiditis one century after hashimoto. *Eur Thyroid J* 2013;1:243-50.
27. Xiaoheng C, Yizhou M, Bei H, i sur. General and Specific Genetic Polymorphism of Cytokines-Related Gene in AITD. *Mediators Inflamm* 2017;2017:3916395.
28. Simmonds MJ. GWAS in autoimmune thyroid disease: redefining our understanding of pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol* 2013;9:277-87.
29. McLeod DS, Cooper DS. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity. *Endocrine* 2012;42:252-65.
30. Merrill SJ, Mu Y. Thyroid autoimmunity as a window to autoimmunity: An explanation for sex differences in the prevalence of thyroid autoimmunity. *J Theor Biol* 2015;375:95-100.
31. McGrogan A, Seaman HE, Wright JW, de Vries CS. The incidence of autoimmune thyroid disease: a systematic review of the literature. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;69:687-96.
32. Fallahi P, Ferrari SM, Ruffilli I, i sur. 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;15:1125-8.
33. Frohlich E, Wahl R. Thyroid Autoimmunity: Role of Anti-thyroid Antibodies in Thyroid and Extra-Thyroidal Diseases. *Front Immunol* 2017;8:521.

34. Ajjan RA, Weetman AP. The Pathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis: Further Developments in our Understanding. *Horm Metab Res* 2015;47:702-10.
35. McLachlan SM, Rapoport B. Why measure thyroglobulin autoantibodies rather than thyroid peroxidase autoantibodies? *Thyroid* 2004;14:510-20.
36. Zaletel K. Determinants of thyroid autoantibody production in Hashimoto's thyroiditis. *Expert Rev Clin Immunol* 2007;3:217-23.
37. Radetti G. Clinical aspects of Hashimoto's thyroiditis. *Endocr Dev* 2014;26:158-70.
38. McLachlan SM, Rapoport B. Autoimmune response to the thyroid in humans: thyroid peroxidase--the common autoantigenic denominator. *Int Rev Immunol* 2000;19:587-618.
39. Brix TH, Hegedus L. Twin studies as a model for exploring the aetiology of autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012;76:457-64.
40. Aghini Lombardi F, Fiore E, Tonacchera M, i sur. The effect of voluntary iodine prophylaxis in a small rural community: the Pescopagano survey 15 years later. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:1031-9.
41. Bjergved L, Jorgensen T, Perrild H, i sur. Predictors of change in serum TSH after iodine fortification: an 11-year follow-up to the DanThyr study. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:4022-9.
42. Teng X, Shan Z, Chen Y, i sur. More than adequate iodine intake may increase subclinical hypothyroidism and autoimmune thyroiditis: a cross-sectional study based on two Chinese communities with different iodine intake levels. *Eur J Endocrinol* 2011;164:943-50.
43. Teng W, Shan Z, Teng X, i sur. Effect of iodine intake on thyroid diseases in China. *N Engl J Med* 2006;354:2783-93.
44. Caselli E, Zatelli MC, Rizzo R, i sur. Virologic and immunologic evidence supporting an association between HHV-6 and Hashimoto's thyroiditis. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002951.
45. Dittfeld A, Gwizdek K, Michalski M, Wojnicz R. A possible link between the Epstein-Barr virus infection and autoimmune thyroid disorders. *Cent Eur J Immunol* 2016;41:297-301.
46. Vanderpump MP, Tunbridge WM, French JM, i sur. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995;43:55-68.

47. Baric A, Brcic L, Gracan S, i sur. Thyroglobulin Antibodies are Associated with Symptom Burden in Patients with Hashimoto's Thyroiditis: A Cross-Sectional Study. *Immunol Invest* 2018;1-12.
48. Pearce SH, Brabant G, Duntas LH, i sur. 2013 ETA Guideline: Management of Subclinical Hypothyroidism. *Eur Thyroid J* 2013;2:215-28.
49. Kusic Z, Jukic T, Franceschi M, i sur. [Croatian Thyroid Society guidelines for rational detection of thyroid dysfunction]. *Lijec Vjesn* 2009;131:328-38.
50. Pedersen OM, Aardal NP, Larssen TB, Varhaug JE, Myking O, Vik-Mo H. The value of ultrasonography in predicting autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 2000;10:251-9.
51. Wu G, Zou D, Cai H, Liu Y. Ultrasonography in the diagnosis of Hashimoto's thyroiditis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2016;21:1006-12.
52. Dodig D, Kusić Z. *Klinička nuklearna medicina*. Zagreb: Medicinska naklada; 2012.
53. Turnpenny P, Ellard, S. *Emeryjeve osnove medicinske genetike*. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
54. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta* 2006;371:1-12.
55. Weiss KM, Clark AG. Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. *Trends Genet* 2002;18:19-24.
56. Bush WS, Moore JH. Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLoS Comput Biol* 2012;8:e1002822.
57. Marchini J, Howie B, Myers S, McVean G, Donnelly P. A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nat Genet* 2007;39:906-13.
58. Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, i sur. 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *Am J Hum Genet* 2017;101:5-22.
59. Jabrocka-Hybel A, Skalniak A, Piatkowski J, i sur. How much of the predisposition to Hashimoto's thyroiditis can be explained based on previously reported associations? *J Endocrinol Invest* 2018.
60. Huang CY, Chang TY, Chu CC, i sur. The HLA-B gene and Hashimoto disease in Han Chinese children: a case-control and family-based study. *Tissue Antigens* 2012;80:431-6.
61. Ueda S, Oryoji D, Yamamoto K, i sur. Identification of independent susceptible and protective HLA alleles in Japanese autoimmune thyroid disease and their epistasis. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E379-83.



62. Tandon N, Zhang L, Weetman AP. HLA associations with Hashimoto's thyroiditis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1991;34:383-6.
63. Petrone A, Giorgi G, Mesturino CA, i sur. Association of DRB1\*04-DQB1\*0301 haplotype and lack of association of two polymorphic sites at CTLA-4 gene with Hashimoto's thyroiditis in an Italian population. *Thyroid* 2001;11:171-5.
64. Badenhop K, Schwarz G, Walfish PG, Drummond V, Usadel KH, Bottazzo GF. Susceptibility to thyroid autoimmune disease: molecular analysis of HLA-D region genes identifies new markers for goitrous Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1131-7.
65. Ji R, Feng Y, Zhan WW. Updated analysis of studies on the cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 gene A49G polymorphism and Hashimoto's thyroiditis risk. *Genet Mol Res* 2013;12:1421-30.
66. Luo L, Cai B, Liu F, Hu X, Wang L. Association of Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor 22 (PTPN22) C1858T gene polymorphism with susceptibility to autoimmune thyroid diseases: a meta-analysis. *Endocr J* 2012;59:439-45.
67. Li M, Sun H, Liu S, i sur. CD40 C/T-1 polymorphism plays different roles in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis: a meta-analysis. *Endocr J* 2012;59:1041-50.
68. Zaaber I, Mestiri S, Marmouch H, i sur. Polymorphisms in TSHR and IL1RN genes and the risk and prognosis of Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity* 2014;47:113-8.
69. Yan N, Yu YL, Yang J, i sur. Association of interleukin-17A and -17F gene single-nucleotide polymorphisms with autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity* 2012;45:533-9.
70. Lacka K, Paradowska-Gorycka A, Maciejewski A, Kramer L, Herman WA, Lacki JK. Interleukin 1 beta (IL1beta) gene polymorphisms (SNP-511 and SNP+3953) in Hashimoto's thyroiditis among the Polish population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2014;122:544-7.
71. Tomizawa R, Watanabe M, Inoue N, i sur. Association of functional GTR gene polymorphisms related to expression of glucocorticoid-induced tumour necrosis factor-receptor (GTR) molecules with prognosis of autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol* 2011;165:141-7.
72. Xiao L, Muhali FS, Cai TT, i sur. Association of single-nucleotide polymorphisms in the STAT3 gene with autoimmune thyroid disease in Chinese individuals. *Funct Integr Genomics* 2013;13:455-61.

73. Santos LR, Duraes C, Mendes A, i sur. A polymorphism in the promoter region of the selenoprotein S gene (SEPS1) contributes to Hashimoto's thyroiditis susceptibility. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E719-23.
74. Li M, Liu B, Li L, Zhang C, Zhou Q. Association studies of SEPS1 gene polymorphisms with Hashimoto's thyroiditis in Han Chinese. *J Hum Genet* 2015;60:427-33.
75. Denny JC, Crawford DC, Ritchie MD, i sur. Variants near FOXE1 are associated with hypothyroidism and other thyroid conditions: using electronic medical records for genome- and phenome-wide studies. *Am J Hum Genet* 2011;89:529-42.
76. Eriksson N, Tung JY, Kiefer AK, i sur. Novel associations for hypothyroidism include known autoimmune risk loci. *PLoS One* 2012;7:e34442.
77. Pickrell JK, Berisa T, Liu JZ, Segurel L, Tung JY, Hinds DA. Detection and interpretation of shared genetic influences on 42 human traits. *Nat Genet* 2016;48:709-17.
78. Cooper JD, Simmonds MJ, Walker NM, i sur. Seven newly identified loci for autoimmune thyroid disease. *Hum Mol Genet* 2012;21:5202-8.
79. Oryoji D, Ueda S, Yamamoto K, i sur. Identification of a Hashimoto thyroiditis susceptibility locus via a genome-wide comparison with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:E319-24.
80. Tomer Y, Dolan LM, Kahaly G, i sur. Genome wide identification of new genes and pathways in patients with both autoimmune thyroiditis and type 1 diabetes. *J Autoimmun* 2015;60:32-9.
81. Li YR, Li J, Zhao SD, i sur. Meta-analysis of shared genetic architecture across ten pediatric autoimmune diseases. *Nat Med* 2015;21:1018-27.
82. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, i sur. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet* 2008;9:356-69.
83. Rudan I, Marusic A, Jankovic S, i sur. "10001 Dalmatians:" Croatia launches its national biobank. *Croat Med J* 2009;50:4-6.
84. Stefanic M, Papic S, Suver M, Glavas-Obrovac L, Karner I. Association of vitamin D receptor gene 3'-variants with Hashimoto's thyroiditis in the Croatian population. *Int J Immunogenet* 2008;35:125-31.
85. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, i sur. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;81:559-75.

86. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007;447:661-78.
87. Morris JA, Randall JC, Maller JB, Barrett JC. Evoker: a visualization tool for genotype intensity data. *Bioinformatics* 2010;26:1786-7.
88. Delaneau O, Zagury JF, Marchini J. Improved whole-chromosome phasing for disease and population genetic studies. *Nat Methods* 2013;10:5-6.
89. Howie BN, Donnelly P, Marchini J. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS Genet* 2009;5:e1000529.
90. Zhou X, Stephens M. Genome-wide efficient mixed-model analysis for association studies. *Nat Genet* 2012;44:821-4.
91. Willer CJ, Li Y, Abecasis GR. METAL: fast and efficient meta-analysis of genomewide association scans. *Bioinformatics* 2010;26:2190-1.
92. Stouffer SA. *The American soldier*. Princeton,: Princeton University Press; 1949.
93. Lessel D, Vaz B, Halder S, i sur. Mutations in SPRTN cause early onset hepatocellular carcinoma, genomic instability and progeroid features. *Nat Genet* 2014;46:1239-44.
94. Pruim RJ, Welch RP, Sanna S, i sur. LocusZoom: regional visualization of genome-wide association scan results. *Bioinformatics* 2010;26:2336-7.
95. Nagelkerke NJD. A Note on a General Definition of the Coefficient of Determination. *Biometrika* 1991;78:691-2.
96. Porcu E, Medici M, Pistis G, i sur. A meta-analysis of thyroid-related traits reveals novel loci and gender-specific differences in the regulation of thyroid function. *PLoS Genet* 2013;9:e1003266.
97. Tylee DS, Sun J, Hess JL, i sur. Genetic correlations among neuro-behavioral and immune-related phenotypes based on genome-wide association data. 2016.
98. Lauc G, Huffman JE, Pucic M, i sur. Loci associated with N-glycosylation of human immunoglobulin G show pleiotropy with autoimmune diseases and haematological cancers. *PLoS Genet* 2013;9:e1003225.
99. Yuan S, Li Q, Zhang Y, i sur. Changes in anti-thyroglobulin IgG glycosylation patterns in Hashimoto's thyroiditis patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:717-24.
100. Otowa T, Yoshida E, Sugaya N, i sur. Genome-wide association study of panic disorder in the Japanese population. *J Hum Genet* 2009;54:122-6.

101. Ulveling D, Le Clerc S, Cobat A, i sur. A new 3p25 locus is associated with liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus/hepatitis C virus-coinfected patients. *Hepatology* 2016;64:1462-72.
102. Dahlin A, Litonjua A, Irvin CG, i sur. Genome-wide association study of leukotriene modifier response in asthma. *Pharmacogenomics J* 2016;16:151-7.
103. Lutz SM, Cho MH, Young K, i sur. A genome-wide association study identifies risk loci for spirometric measures among smokers of European and African ancestry. *BMC Genet* 2015;16:138.
104. Palmer ND, Goodarzi MO, Langefeld CD, i sur. Genetic Variants Associated With Quantitative Glucose Homeostasis Traits Translate to Type 2 Diabetes in Mexican Americans: The GUARDIAN (Genetics Underlying Diabetes in Hispanics) Consortium. *Diabetes* 2015;64:1853-66.
105. Vaidyanathan U, Isen JD, Malone SM, Miller MB, McGue M, Iacono WG. Heritability and molecular genetic basis of electrodermal activity: a genome-wide association study. *Psychophysiology* 2014;51:1259-71.
106. Ahola-Olli AV, Wurtz P, Havulinna AS, i sur. Genome-wide Association Study Identifies 27 Loci Influencing Concentrations of Circulating Cytokines and Growth Factors. *Am J Hum Genet* 2017;100:40-50.
107. Batut P, Dobin A, Plessy C, Carninci P, Gingeras TR. High-fidelity promoter profiling reveals widespread alternative promoter usage and transposon-driven developmental gene expression. *Genome Res* 2013;23:169-80.
108. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012;489:57-74.
109. Kamburov A, Stelzl U, Lehrach H, Herwig R. The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. *Nucleic Acids Res* 2013;41:D793-800.
110. Kero J, Ahmed K, Wettschureck N, i sur. Thyrocyte-specific Gq/G11 deficiency impairs thyroid function and prevents goiter development. *J Clin Invest* 2007;117:2399-407.
111. Arnaud-Lopez L, Usala G, Ceresini G, i sur. Phosphodiesterase 8B gene variants are associated with serum TSH levels and thyroid function. *Am J Hum Genet* 2008;82:1270-80.
112. Herold C, Hooli BV, Mullin K, i sur. Family-based association analyses of imputed genotypes reveal genome-wide significant association of Alzheimer's disease with OSBPL6, PTPRG, and PDCL3. *Mol Psychiatry* 2016;21:1608-12.

113. Lee MK, Shaffer JR, Leslie EJ, i sur. Genome-wide association study of facial morphology reveals novel associations with *FREM1* and *PARK2*. *PLoS One* 2017;12:e0176566.
114. Scherag A, Schoneweck F, Kesselmeier M, i sur. Genetic Factors of the Disease Course after Sepsis: A Genome-Wide Study for 28Day Mortality. *EBioMedicine* 2016;12:239-46.
115. Pilling LC, Atkins JL, Bowman K, i sur. Human longevity is influenced by many genetic variants: evidence from 75,000 UK Biobank participants. *Aging (Albany NY)* 2016;8:547-60.
116. Hart AB, Engelhardt BE, Wardle MC, i sur. Genome-wide association study of d-amphetamine response in healthy volunteers identifies putative associations, including cadherin 13 (*CDH13*). *PLoS One* 2012;7:e42646.
117. Saiardi A, Nagata E, Luo HR, Snowman AM, Snyder SH. Identification and characterization of a novel inositol hexakisphosphate kinase. *J Biol Chem* 2001;276:39179-85.
118. Staley JR, Blackshaw J, Kamat MA, i sur. PhenoScanner: a database of human genotype-phenotype associations. *Bioinformatics* 2016;32:3207-9.
119. Okada Y, Wu D, Trynka G, i sur. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 2014;506:376-81.
120. Boelaert K, Newby PR, Simmonds MJ, i sur. Prevalence and relative risk of other autoimmune diseases in subjects with autoimmune thyroid disease. *Am J Med* 2010;123:183 e1-9.
121. Bliddal S, Borresen SW, Feldt-Rasmussen U. Thyroid Autoimmunity and Function after Treatment with Biological Antirheumatic Agents in Rheumatoid Arthritis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017;8:179.
122. Nakabayashi K, Tajima A, Yamamoto K, i sur. Identification of independent risk loci for Graves' disease within the MHC in the Japanese population. *J Hum Genet* 2011;56:772-8.
123. Kestenbaum B, Glazer NL, Kottgen A, i sur. Common genetic variants associate with serum phosphorus concentration. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:1223-32.
124. Yang SK, Hong M, Zhao W, i sur. Genome-wide association study of Crohn's disease in Koreans revealed three new susceptibility loci and common attributes of genetic susceptibility across ethnic populations. *Gut* 2014;63:80-7.
125. Ruark E, Seal S, McDonald H, i sur. Identification of nine new susceptibility loci for testicular cancer, including variants near *DAZL* and *PRDM14*. *Nat Genet* 2013;45:686-9.

126. Chung CC, Kanetsky PA, Wang Z, i sur. Meta-analysis identifies four new loci associated with testicular germ cell tumor. *Nat Genet* 2013;45:680-5.
127. Meta-analysis of GWAS of over 16,000 individuals with autism spectrum disorder highlights a novel locus at 10q24.32 and a significant overlap with schizophrenia. *Mol Autism* 2017;8:21.
128. Goes FS, McGrath J, Avramopoulos D, i sur. Genome-wide association study of schizophrenia in Ashkenazi Jews. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2015;168:649-59.
129. Schick UM, Jain D, Hodonsky CJ, i sur. Genome-wide Association Study of Platelet Count Identifies Ancestry-Specific Loci in Hispanic/Latino Americans. *Am J Hum Genet* 2016;98:229-42.
130. Soranzo N, Spector TD, Mangino M, i sur. A genome-wide meta-analysis identifies 22 loci associated with eight hematological parameters in the HaemGen consortium. *Nat Genet* 2009;41:1182-90.
131. Berndt SI, Skibola CF, Joseph V, i sur. Genome-wide association study identifies multiple risk loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2013;45:868-76.
132. Slager SL, Skibola CF, Di Bernardo MC, i sur. Common variation at 6p21.31 (BAK1) influences the risk of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;120:843-6.
133. Cho WK, Jung MH, Choi EJ, Choi HB, Kim TG, Suh BK. Association of HLA alleles with autoimmune thyroid disease in Korean children. *Horm Res Paediatr* 2011;76:328-34.
134. Sasazuki T, Inoko H, Morishima S, Morishima Y. Gene Map of the HLA Region, Graves' Disease and Hashimoto Thyroiditis, and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Adv Immunol* 2016;129:175-249.

## **8. SAŽETAK**

Hashimotov tireoiditis (HT) najčešći je oblik autoimune bolesti štitnjače. Glavno obilježje HT-a jest kronična upala i smanjena funkcija štitnjače. Trenutno znanje o genetskim čimbenicima uključenim u razvoj HT-a je ograničeno, te dosad nije provedena nijedna cjelogenomska studija povezanosti fokusirana isključivo na HT. S ciljem otkrivanja genetičkih odrednica HT-a, proveli smo prvu cjelogenomsku analizu povezanosti HT-a praćenu replikacijom u ukupno 1443 ispitanika iz Hrvatske, uključujući 708 ispitanika oboljelih od HT-a i 735 ispitanika iz kontrolne skupine.

Početna skupina sastojala se od 430 ispitanika oboljelih od HT-a i 439 kontrola koji pripadaju splitskoj regiji. Dijagnoza bolesti prvenstveno je postavljena na osnovi kliničkog pregleda, karakteristične ultrazvučne slike štitnjače (nehomogeno i često hipoehogeno tkivo štitnjače) i krvnih koncentracija hormona i protutijela štitnjače (TPOAt i TgAt), slijedeći preporuke i smjernice Europske udruge za štitnjaču. Analiza povezanosti između 8.6 milijuna genetskih varijanti i HT-a provedena je uporabom modela linearne regresije sa slučajnim učincima, gdje je status bolesti tretiran kao kvantitativna varijabla. Trinaest najznačajnijih nezavisnih genetskih varijanti ( $P < 10^{-5}$ ) odabrano je za genotipizaciju u dvije nezavisne replikacijske skupine koje su uključile ukupno 303 ispitanika oboljela od HT-a i 302 kontrole koji pripadaju osiječkoj regiji, odnosno splitskoj regiji. U završnom koraku, provedena je meta-analiza rezultata za odabrane varijante između početne skupine i replikacijskih skupina.

Otkrivene su tri nove genetske varijante povezane s HT-om: rs12944194 udaljen 206 kb od *SDK2* gena ( $P = 1.8 \times 10^{-6}$ ,  $\beta = -0.088$ ,  $SE = 0.018$ ), rs75201096 smješten unutar *GNA14* gena ( $P = 2.41 \times 10^{-5}$ ,  $\beta = -0.252$ ,  $SE = 0.06$ ) i rs791903 smješten unutar *IP6K3* gena ( $P = 3.16 \times 10^{-5}$ ,  $\beta = 0.07$ ,  $SE = 0.017$ ). Genetski rizični skor (GRS), izračunat uporabom rizičnih alela otkrivenih lokusa, objašnjava 4.82% ukupne varijabilnosti u HT-u, a ispitanici iz gornjeg GRS kvartila imaju 2.76 puta veće izgleda za razvoj HT-a u usporedbi s ispitanicima iz donjeg GRS kvartila.

Sva tri otkrivena lokusa po prvi put su povezana s nastankom HT-a, međutim poznato je da su genomske regije koje okružuju navedene lokuse uključene u regulaciju funkcije štitnjače i razvoj različitih autoimunih bolesti. Dodatno, uočena je zajednička genetska pozadina između HT-a i nekoliko drugih fenotipova, posebice hipotireoze, Gravesove bolesti i TPOAt-a. Zaključno, ovo istraživanje donosi nova saznanja o genetskoj podlozi HT-a i postavlja čvrste temelje za daljnja genetska istraživanja ove učestale, ali slabo istražene bolesti.



## **9. SUMMARY**

Hashimoto's thyroiditis (HT) is the most common form of autoimmune thyroid disease characterized by chronic inflammation and reduced function of the thyroid gland. Current knowledge of HT genetics is very limited, and not a single genome-wide association study (GWAS) focusing exclusively on HT has been performed to date. In order to decipher genetic determinants of HT, we performed the first GWAS followed by replication in a total of 1443 individuals from Croatia, including 708 HT cases and 735 controls.

The discovery dataset included 430 HT cases and 439 controls from the region of Split (South Croatia). Diagnosis of HT was primarily based on clinical examination, characteristic thyroid ultrasound image (unhomogenic and/or hypoechogenic thyroid tissue) and evaluation of thyroid hormones and antibodies (TPOAb and TgAb), according to ETA (European Thyroid Association) recommendations and guidelines. Association analysis between 8.6 million genetic variants and HT was performed using univariate linear model with random effects, by treating binary disease status as quantitative trait. Thirteen most significant independent genetic variants ( $P < 10^{-5}$ ) were selected for genotyping in 303 HT cases and 302 controls from two independent replication cohorts from the region of Osijek (East Croatia) and region of Split (South Croatia). As the final step, we performed meta-analysis across discovery and replication cohorts for selected variants.

We identified three suggestive associations of novel variants with HT: rs12944194 located 206 kb from *SDK2* gene ( $P = 1.8 \times 10^{-6}$ ,  $\beta = -0.088$ ,  $SE = 0.018$ ), rs75201096 inside *GNA14* gene ( $P = 2.41 \times 10^{-5}$ ,  $\beta = -0.252$ ,  $SE = 0.06$ ) and rs791903 inside *IP6K3* gene ( $P = 3.16 \times 10^{-5}$ ,  $\beta = 0.07$ ,  $SE = 0.017$ ). Genetic risk score (GRS), calculated using risk alleles of these three loci, accounted for 4.82% of the total HT variance, and individuals from the top GRS quartile had 2.76 times higher odds for HT than individuals from the lowest GRS quartile.

These three loci are implicated with susceptibility to HT for the first time. Nevertheless, genomic regions harboring these loci exhibit good biological candidacy for HT development, due to their involvement in the regulation of the thyroid gland function and autoimmunity. Additionally, we observe genetic overlap between HT and several related traits, such as hypothyroidism, Graves' disease and TPOAb. In conclusion, this study adds a new knowledge of underlying HT genetics and sets a firm basis for further research of this common, yet poorly investigated disease.

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođen sam 28. 4. 1989. u Splitu, gdje sam završio Osnovnu školu Trstenik i III. gimnaziju. 2011. godine stječem titulu sveučilišnog prvostupnika matematike na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Iste godine upisujem diplomski sveučilišni studij matematičke statistike pri istom fakultetu te 2014. godine stječem titulu magistra matematike (smjer Matematička statistika). 2015. godine upisujem poslijediplomski doktorski studije TRIBE (Translacijska istraživanja u biomedicini) na Medicinskom fakultetu u Splitu.

Od 2014. do 2016. godine radim kao vanjski suradnik - asistent na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu gdje održavam auditorne vježbe iz kolegija Biostatistika, Primijenjena statistika, Uvod u numeričku matematiku, Matematika II, Diferencijalni i integralni račun I, Diferencijalni i integralni račun II i Uvod u matematiku. Od 2015. godine do danas radim kao vanjski suradnik - asistent na Sveučilišnom odjelu za stručne studije u Splitu gdje održavam auditorne vježbe iz kolegija Statistika i Poslovna statistika.

Od 2015. godine do danas zaposlen sam na Medicinskom fakultetu u Splitu, na Katedri za medicinsku biologiju, gdje radim kao doktorand pri HRZZ projektu "Cjelogenomska analiza povezanosti Hashimotovg tireoiditisa".

Autor sam 8 originalnih znanstvenih publikacija indeksiranih u "Current Contest" (od čega tri s prvim autorstvom), 12 kongresnih sažetaka i jednog stručnog rada.

#### **Objavljeni znanstveni radovi:**

1. Hackinger S, Prins B, Mamakou V, Zengini E, Marouli E, **Brčić L**, Serafetinidis I, Lamnissou K, Kontaxakis V, Dedoussi G, Gonidakis F, Thanopoulou A, Tentolouris N, Tsezou A, Zeggini E. 2018. Evidence for genetic contribution to the increased risk of type 2 diabetes in schizophrenia. *Translational Psychiatry*. (u tisku)
2. **Brčić L**, Barić A, Gračan S, Brekalo M, Kaličanin D, Gunjača I, Torlak Lovrić V, Tokić S, Radman M, Škrabić V, Miljković A, Kolčić I, Štefanić M, Glavaš-Obrovac Lj, Lessel D, Polašek O, Zemunik T, Barbalić M, Punda A, Boraska Perica V. 2018. Genome-wide association analysis suggests novel loci for Hashimoto's thyroiditis. *Journal of Endocrinological Investigation*.

3. Barić A, **Brčić L**, Gračan S, Škrabić V, Brekalo M, Šimunac M, Torlak Lovrić V, Anić I, Barbalić M, Zemunik T, Punda A, Boraska Perica V. 2018. Thyroglobulin antibodies are associated with symptom burden in patients with Hashimoto's thyroiditis: a cross-sectional study. *Immunological investigations*.
4. Kaličanin D, **Brčić L**, Barić A, Zlodre S, Barbalić M, Torlak Lovrić V, Punda A, Boraska Perica V. 2018. Evaluation of Correlations Between Food-Specific Antibodies and Clinical Aspects of Hashimoto's Thyroiditis. *Journal of the American College of Nutrition* 1-8.
5. Barić A, **Brčić L**, Gračan S, Torlak Lovrić V, Gunjača I, Šimunac M, Brekalo M, Boban M, Polašek O, Barbalić M, Zemunik T, Punda A, Boraska Perica V. 2017. Association of established hypothyroidism-associated genetic variants with Hashimoto's thyroiditis. *Journal of endocrinological investigation* 40(10):1061-1067.
6. **Brčić L**, Gračan S, Barić A, Gunjača I, Torlak Lovrić V, Kolčić I, Zemunik T, Polašek O, Barbalić M, Punda A, Boraska Perica V. 2017. Association of Established Thyroid-stimulating Hormone and Free Thyroxine Genetic Variants with Hashimoto's Thyroiditis. *Immunological investigations* 46(6):625-638.
7. Boraska Jelavić T, Boban T, **Brčić L**, Vrdoljak E. 2017. Is macrocytosis a potential biomarker of the efficacy of dose-dense paclitaxel-carboplatin combination therapy in patients with epithelial ovarian cancer? *Anti-cancer drugs* 28(8):922-927.
8. **Brčić L**, Barić A, Gračan S, Brdar D, Torlak Lovrić V, Vidan N, Zemunik T, Polašek O, Barbalić M, Punda A, Boraska Perica V. 2016. Association of established thyroid peroxidase autoantibody (TPOAb) genetic variants with Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity* 49(7):480-48

#### **Objavljeni kongresni sažeci:**

1. Hackinger S, Prins B, Mamakou V, Zengini E, Marouli E, **Brčić L**, Serafetinidis I, Lamnissou K, Kontaxakis V, Dedoussi G, Gonidakis F, Thanopoulou A, Tentolouris N, Tsezou A, Zeggini E. Evidence for genetic contribution to the increased risk of type 2 diabetes in schizophrenia. 68th Annual meeting of the American Society of Human Genetics, 16-20 October, San Diego, USA

2. Kaličanin D, **Brčić L**, Barić A, Gračan S, Brekalo M, Torlak Lovrić V, Kolčić I, Polašek O, Zemunik T, Punda A, Boraska Perica V. Food frequency questionnaire analysis in patients with Hashimoto's thyroiditis. 11. međunarodni znanstveno-stručni skup Hranom do zdravlja, October 18-19 2018, Split, Croatia
3. **Brčić L**, Barić A, Brekalo M, Gračan S, Škrabić V, Kaličanin D, Novak I, Zemunik T, Barbalić M, Punda A, Boraska Perica V. Apoptosis-antagonizing transcription factor AATF and chromatin-remodeling SMARCA2 are associated with thyroid volume in Hashimoto's thyroiditis patients. 4th Congress of Croatian Geneticists with international participation. 26-29 September 2018, Krk, Croatia.
4. **Brčić L**, Barić A, Gračan S, Torlak Lovrić V, Brekalo M, Škrabić V, Zemunik T, Barbalić M, Punda A, Boraska Perica V. Genome-wide association analysis suggests novel loci underlying thyroid antibodies in Hashimoto's thyroiditis. 4th Congress of Croatian Geneticists with international participation. 26-29 September 2018, Krk, Croatia.
5. Boraska Perica V, **Brčić L**, Barić A, Gračan S, Kaličanin D, Gunjača I, Torlak Lovrić V, Brekalo M, Radman M, Škrabić V, Miljković A, Kolčić I, Tokić S, Štefanić M, Glavaš-Obrovac Lj, Polašek O, Zemunik T, Barbalić M, Punda A. A genome-wide association analysis of Hashimoto's thyroiditis. 67th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 17-21 October 2017, Orlando, USA
6. **Brčić L**, Barić A, Gračan S, Gunjača I, Torlak Lovrić V, Brekalo M, Škrabić V, Zemunik T, Barbalić M, Punda A, Boraska Perica V. Genome-wide association analysis of thyroid volume and thyroid antibodies in Hashimoto's thyroiditis. Second Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies, 24-28 September 2017, Split, Croatia
7. **Brčić L**, Barić A, Gračan S, Kaličanin D, Gunjača I, Torlak Lovrić V, Brekalo M, Radman M, Škrabić V, Tokić S, Štefanić M, Glavaš-Obrovac Lj, Zemunik T, Barbalić M, Punda A, Boraska Perica V. Genome-wide association analysis approach in identifying loci for complex diseases, an example for Hashimoto's thyroiditis. Second Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies, 24-28 September 2017, Split, Croatia
8. Kaličanin D, **Brčić L**, Barić A, Zlodre S, Barbalić M, Torlak Lovrić V, Punda A, Boraska Perica V. Genome-wide association analysis of food intolerance in patients with Hashimoto's thyroiditis. 10th ISABS Conference in Forensic, Anthropologic and

Medical Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine, 19-24 June 2017, Dubrovnik, Croatia

9. Barić A, **Brčić L**, Gračan S, Torlak Lovrić V, Gunjača I, Šimunac M, Boban M, Zemunik T, Polašek O, Barbalić M, Punda A, Boraska Perica V. Association of established hypothyroidism associated genetic variants with Hashimoto's thyroiditis. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 15-19 October 2016, Barcelona, Spain
10. Boraska Jelavić T, Boban T, **Brčić L**, Vrdoljak E. First-line chemotherapy with paclitaxel and platinum salt induces macrocytosis in epithelial ovarian cancer patients. 12th Central European Oncology Congress, 22-25 June 2016, Opatija, Croatia
11. **Brčić L**, Barić A, Gračan S, Brdar D, Torlak Lovrić V, Vidan N, Zemunik T, Polašek O, Barbalić M, Punda A, Boraska Perica V. Hashimoto's thyroiditis and thyroid peroxidase autoantibody levels share genetic background. VI. Hrvatski kongres humane genetike s međunarodnim sudjelovanjem, 5.-7. 11.2015., Split, Hrvatska
12. **Brčić L**. Deciphering genetic basis of Hashimoto's thyroiditis. 4th Sardinian International Summer School „From genome-wide association studies to function“, 22-26 June 2015, Pula, Sardinia, Italy

#### **Objavljeni stručni radovi:**

1. **Brčić L**, Pažanin D, Pažanin I. 2014 Stohastički model rasta populacije (A stochastic model for population growth) Osječki matematički list 14, 23-34

#### **Održana predavanja:**

1. Oralna prezentacija „*Genome-wide association analysis suggests novel loci underlying thyroid antibodies in Hashimoto's thyroiditis*“ na međunarodnom kongresu „4th Congress of Croatian Geneticists with international participation“, 26.-29.9.2018., Krk, Croatia.
2. Oralna prezentacija „*Genome-wide association analysis of thyroid volume and thyroid antibodies in Hashimoto's thyroiditis*“ na međunarodnom kongresu „Second Adriatic

Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies“, 24.-28.9.2017., MEDILS, Split, Hrvatska.

3. Predavanje „*Genome-wide quality control procedures and imputation*“ na radionici „Genetic analysis of thyroid and parathyroid function“, 15.-16.5.2017., Medicinski fakultet, Split, Hrvatska.



## **11. DODATAK**

## 11.1. Dodatak 1 – informirani pristanak



Sveučilište u Splitu  
Medicinski fakultet  
Universitas Studiorum  
Spalatensis  
Facultas Medica  
Šoltanska 2, 21000 Split  
Hrvatska

Doc. dr. sc. Vesna Boraska  
Katedra za medicinsku biologiju  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

### **NAZIV PROJEKTA: Otkrivanje genetskih varijanti uključenih u razvoj bolesti štitnjače**

TRAJANJE PROJEKTA: 5 godina

NAZIV USTANOVE: Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

Pozivamo Vas da sudjelujete u znanstvenom istraživanju „**Otkrivanje genetskih varijanti uključenih u razvoj bolesti štitnjače**“. Vaši prikupljeni podaci bit će korišteni u znanstvene svrhe, s ciljem boljeg razumijevanja genetskih odrednica koje sudjeluju u razvoju bolesti štitnjače. Ova obavijest će Vam pružiti podatke čija je svrha pomoći Vam odlučiti da li želite sudjelovati u ovom znanstvenom istraživanju. Prije nego što odlučite, želimo da shvatite zašto se to istraživanje provodi i što ono uključuje. Zato Vas molimo da pažljivo pročitate ovu obavijest. Ukoliko u ovoj obavijesti ne razumijete neke riječi, molimo pitajte liječnika koji sudjeluje u ovom znanstvenom istraživanju.

Bolesti štitnjače pogađaju više od 10% populacije i time predstavljaju važan javnozdravstveni problem. Osnovni cilj ovog projekta je identificirati genetske biljege koji sudjeluju u razvoju bolesti štitnjače. Iz Vaše krvi, koja će biti uzeta samo jedanput, bit će izolirana DNA molekula (Vaš genom) iz koje će se potom odrediti sve genetske varijante (genotipovi i/ili ukupan slijed nukleotida). Usporedbom genetskih varijanti između zdravih i oboljelih pojedinaca u tzv. analizi cjelokupnog genoma pokušati ćemo istražiti njihovu povezanost s nastankom bolesti štitnjače. Analiza cjelokupnog genoma je dokazano pouzdana metoda u istraživanju genetske predispozicije složenih bolesti a bazira se na pretpostavci da sve genomske regije mogu imati jednaki utjecaj na nastanak neke bolesti. U ovom projektu bi se također prikupili Vaši anamnestički podaci, podaci o stilu života i prehrani kroz nekoliko upitnika te fiziološki i biokemijski parametri kroz mjerenja iz seruma, a sve radi sveukupnog boljeg razumijevanja nastanka bolesti štitnjače. Opisano istraživanje ima ulogu pomoći u razumijevanju temeljnih bioloških putova povezanih s funkcijom štitnjače i mehanizama nastanka bolesti štitnjače, a sve u cilju poboljšanja liječenja bolesti, odnosno, za razvoj novih preventivskih, dijagnostičkih i terapijskih metoda.

Rezultati studije će biti javno dostupni tj. objavljivati će se u znanstvenim publikacijama. Vaš identitet će zauvijek ostati anonimn. Bilo kakvi usputni genetski pronalasci proizašli iz ove studije Vam se neće priopćavati. Sudjelovanje u istraživanju je dobrovoljno i ne postoji jamstvo da ćete Vi imati koristi od sudjelovanja u istraživanju. Među koristima ubraja se mogućnost da Vi i ovo istraživanje pomognete u nalaženju bolje terapije za bolesnike s istom bolesti. Rizici zbog sudjelovanja u studiji uglavnom ne postoje, osim moguće blage nelagodice prilikom vađenja krvi.

Na Vama je da odlučite želite li sudjelovati ili ne. Ako odlučite sudjelovati dobit ćete na potpis ovu obavijest (jedan primjerak zadržite). Vaše sudjelovanje je dobrovoljno i možete se slobodno i bez ikakvih posljedica povući u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga. Nastavit ćete se dalje liječiti na način koji je uobičajen za Vašu bolest. Ako odlučite prekinuti sudjelovanje, molimo da o tome na vrijeme obavijestite glavnog istraživača i njegove suradnike.

Vaši će se osobni podaci obrađivati elektronički, a glavni istraživač i njegovi suradnici pridržavat će se interne procedure za zaštitu osobnih podataka. U bazu podataka bit ćete uneseni pomoću koda. Vašu medicinsku dokumentaciju će pregledavati glavni istraživač i njegovi suradnici. Vaše ime nikada neće biti otkriveno. Pristup dokumentaciji mogu imati predstavnici Etičkog povjerenstva u Ustanovi u kojoj se liječite (lokalno etičko povjerenstvo) i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta.

Ovo ispitivanje pregledalo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, koje je nakon uvida u određenu dokumentaciju odobrilo istraživanje. Ispitivanje se provodi u skladu sa svim primjenljivim smjernicama, čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje sudjeluju u ovom znanstvenom istraživanju, uključujući Osnove dobre kliničke prakse i Helsinšku deklaraciju.

Ako imate dodatnih pitanja vezanih uz ovo istraživanje možete se obratiti glavnom istraživaču ili Vašem liječniku:

Ime i prezime glavnog istraživača: doc. dr. sc. Vesna Boraska

Adresa: Katedra za Medicinsku biologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

Broj telefona: 021-557-873

Ime i prezime glavnog suradnika: Prof. dr. sc. Ante Punda

Adresa: Zavoda za nuklearnu medicinu KBC-a Split,

Broj telefona: 021-556-101

Hvala što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili sudjelovanje u ovom znanstvenom istraživanju.

**Ova obavijest je sastavljena u skladu sa Zakonom o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 150/08) i Zakonom o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).**

Srdačan pozdrav,



Doc. dr. sc. Vesna Boraska, voditelj projekta

## PRISTANAK NA SUDJELOVANJE U ISTRAŽIVANJU

1. Potvrđujem da sam pročitao/pročitala obavijest za navedeno znanstveno istraživanje te sam imao/imala priliku postaviti pitanja DA / NE
2. Razumijem da je moje sudjelovanje dobrovoljno te se mogu povući iz istraživanja u bilo koje vrijeme, bez navođenja razloga i bez ikakvih posljedica po zdravstvenom ili pravnom pitanju DA / NE
3. Razumijem da mojoj medicinskoj dokumentaciji imaju pristup odgovorni pojedinci tj. glavni istraživač i njegovi suradnici. Dajem dozvolu tim pojedincima za pristup mojoj medicinskoj dokumentaciji. DA / NE
4. Želim sudjelovati u navedenom znanstvenom istraživanju DA / NE
5. Uz općenit pristanak na sudjelovanje, dajem i ove dodatne pristanke:
  - Da se u svrhu budućih znanstvenih istraživanja prikupljeni podaci i uzorci mogu poslati na analizu u inozemstvo, ako u Hrvatskoj ne bude postojala oprema za njihovu analizu, ali bez podataka o mojem imenu i prezimenu DA / NE
  - Da se u svrhu budućeg znanstvenog istraživanja smije očitati moja cjelokupna genetska informacija sadržana u DNA (tzv. sekvencioniranje), ali bez podataka o mojem imenu i prezimenu DA / NE
  - Da se u svrhu budućih istraživanja smije dopustiti uvid drugim skupinama istraživača u ove podatke, ali samo uz uvjet da podaci ostanu anonimni i ne mogu se ni na koji način povezati sa mnom DA / NE
  - Da se u svrhu budućih istraživanja moji genetski podaci (genotipovi i sekvenca) mogu skladištiti u svjetskim genetskim repozitorijima DA / NE

PREZIME : \_\_\_\_\_ IME: \_\_\_\_\_

DATUM ROĐENJA: \_\_\_\_\_ MJESTO ROĐENJA: \_\_\_\_\_

TELEFON (mobitel): \_\_\_\_\_

ADRESA: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Potpis sudionika u istraživanju

\_\_\_\_\_  
Šifra

### Povrđuje liječnik:

Datum dolaska: \_\_\_\_\_

Potpis liječnika: \_\_\_\_\_

## 11.2. Dodatak 2 – potvrda etičkog povjerenstva 1

MEDICINSKI FAKULTET  
SVEUČILIŠTA U SPLITU  
**Etičko povjerenstvo**  
Split, 30. svibnja 2014.

Klasa: 003-08/14-03/0001  
Ur. br: 2181-198-03-04-14-0028

### MIŠLJENJE

Etičkog povjerenstva povodom prijave istraživanja:  
**Genome-wide association analysis of Hashimoto thyroiditis**

I. Zaprimljen je zahtjev doc. dr. sc. Vesne Boraske za odobrenje znanstvenog istraživanja pod naslovom **Genome-wide association analysis of Hashimoto thyroiditis (hrv: Cjelogenomska analiza povezanosti Hashimotovog tiroiditisa)** – provedba znanstvenog istraživanja na ljudima.

Predviđeno je da ovo istraživanje započne u rujnu 2014. godine i da traje 3 godine, a provodit će se u Laboratoriju za biologiju Medicinskog fakulteta Split i Laboratoriju za biokemiju Zavoda za nuklearnu medicinu KBC Split.

Glavni cilj projekta je pomoći u razumijevanju temeljnih bioloških putova povezanih sa nastankom Hashimotovog tiroiditisa, a sve u cilju poboljšanja liječenja bolesti i razvoja novih preventivskih, dijagnostičkih i terapijskih metoda.

II. Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu je, prilikom raspravljanja o ovom predmetu, uzelo u obzir navod iz zahtjeva podnositelja da su rizici za ispitanika minimalni te da je omjer rizika i koristi u potpunosti na strani koristi za ispitanika. Također je uzeta u obzir izjava da će identitet ispitanika (zdravog ili pacijenta) uvijek ostati anoniman.

III. Sukladno odredbi članka 16. Etičkog kodeksa Medicinskog fakulteta u Splitu Povjerenstvo je zauzelo stajalište kako je predmetno istraživanje **u skladu s odredbama Etičkog kodeksa** koje reguliraju istraživanja na ljudima u znanstvenom, istraživačkom i stručnom radu i etičkim načelima Helsinške deklaracije.

IV. Mišljenje je doneseno jednoglasno.

Predsjednik Povjerenstva:  
  
Prof. dr. sc. Miroslav Šimunić

#### Dostaviti:

- doc. dr. sc. Vesna Boraska x2
- Arhiv Etičkog povjerenstva Fakulteta
- Arhiv Fakulteta

## 11.3. Dodatak 3 – potvrda etičkog povjerenstva 2

### KLINIČKI BOLNIČKI CENTAR SPLIT ETIČKO POVJERENSTVO

Klasa: 530-02/13-01/11

Ur.br.: 2181-147-01/06/J.B.-14-2

Split, 4. lipnja 2014.g.

#### IZVOD IZ ZAPISNIKA SA SJEDNICE ETIČKOG POVJERENSTVA KBC SPLIT

**Doc.dr.sc. VESNA BORASKA** s Katedre za Medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta u Splitu uputila je Etičkom povjerenstvu KBC Split zahtjev za pregled plana ispitivanja **„Cjelogenomska analiza povezanosti Hashimotovog tiroiditisa“** koji je dobio potporu Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ).

Dio ispitivanja planira se provoditi u Zavodu za nuklearnu medicinu u suradnji s prof.dr.sc. A. Pundom i dr.sc. V.Torlak, A.Barić,dr.med. i S.Gračan, dr.med. Ostali suradnici: prof.dr.sc. T. Zemunik i doc.dr.sc. M. Barbalić s Medicinskog fakulteta u Splitu.

Cilj ispitivanja je :

- utvrditi specifične genske lokuse koji sudjeluju u razvoju Hashimotovog tiroiditisa, jednog od oblika hipotireoze.

Ispitanici:

-ispitanici koji boluju od Hashimotovog tiroiditisa

Metodologija:

-iz uzorka krvi ispitanika, koja se uzima samo jednom, izolirat će se DNA molekula (genom ispitanika) iz koje će se genotipizirati cjelokupni genom uz pomoć Illumina genotipizacijskih čipova i provesti cjelogenomska studija ispitanika i kontrola s ciljem otkrivanja genetskih lokusa koji sudjeluju u etiologiji bolesti Hashimotov tiroiditisa  
- kontrolni uzorci su uzorci već prikupljeni i pohranjeni tijekom istraživanja pod nazivom „10 001 Dalmatinac – Hrvatska biobanka: Odrednice zdravlja i bolesti u općoj i izoliranim ljudskim populacijama“ kojeg provodi doc.dr.sc. Ozren Polašek na Medicinskom fakultetu u Splitu.

Nakon razmatranja zahtjeva, donijet je sljedeći

#### Zaključak

Iz priložene dokumentacije razvidno je da

1. je ispitivanje **„Cjelogenomska analiza povezanosti Hashimotovog tiroiditisa“** podispitivanje koje se planira provesti u sklopu ispitivanja „Otkrivanje genetskih varijanti uključenih u razvoj bolesti štitnjače“ koje je odobreno odlukom ovog Etičkog povjerenstva Klasa: 530-02/13-01/11, Ur.br. 2181-147-01/06/J.B.-13-1 od 21.03.2013.g.
2. se tijekom provođenja ispitivanja štiti identitet i prava ispitanika u skladu sa Zakonom o zaštiti osobnih podataka (NN 103/03-106/12) i Zakonom o zaštiti prava pacijenata (NN169/04, 37/08), te da je ispitivanje usklađeno s odredbama Kodeksa liječničke etike i deontologije (NN 55/08), pravilima dobre kliničke prakse, te pravilima Helsinške deklaracije (1964.-20013.). Etičko povjerenstvo KBC Split je suglasno s provođenjem predloženog ispitivanja u Zavodu za nuklearnu medicinu KBC Split pod uvjetom da troškovi ispitivanja ne idu na teret KBC-a Split te da se prilikom njegovog provođenja poštuju sva navedena etička načela.

Predsjednik Etičkog povjerenstva  
Prof.dr.sc. Jugoslav Bagatin

KLINIČKI BOLNIČKI CENTAR SPLIT  
Etičko povjerenstvo