



Oftalmopati Eşlik Eden ve Etmeyen Graves Hastalığında *FOXP3* Polimorfizmlerinin Türk Popülasyonundaki Rolü

The Role of *FOXP3* Polymorphisms in Graves' Disease with or without Ophthalmopathy in a Turkish Population

© Fulya Yaylıoğlu Tuncay*, © Kübra Serbest Ceylanoğlu**, © Sezen Güntekin Ergün***, © Berçin Tarlan****, © Onur Konuk****

*Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

**Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Ulucanlar Göz Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göz Hastalıkları Kliniği, Ankara, Türkiye

***Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

****Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Öz

Amaç: Forkhead box P3 (*FOXP3*) gen polimorfizmleri, Graves hastalığı (GH) ve pek çok diğer otoimmün hastalıkta farklı popülasyonlarda değerlendirilmiştir. Ancak bu polimorfizmler Türk popülasyonunda GH'de ve Graves oftalmopatisinde (GO) henüz incelenmemiştir. Bu çalışmada, Türk toplumu örneğinde *FOXP3* polimorfizmlerinin sıklığını oftalmopati eşlik eden ve etmeyen GH'de değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya GO tanısı alan 100 hasta, oftalmopati eşlik etmeyen GH tanısı alan 74 hasta, yaş ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş 100 sağlıklı kontrol dahil edildi. Çalışmaya dahil olan tüm katılımcılarda rs3761547 (-3499 A/G), rs3761548 (-3279 C/A), rs3761549 (-2383 C/T) tek nükleotid polimorfizmleri (TNP) polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi yöntemiyle belirlendi. Genotip ve allel frekanslarını değerlendirmek için ki-kare testi kullanıldı. Genotip ve allel riskleri için odds oranı ve %95 güven aralıkları hesaplandı.

Bulgular: Hasta grubunda (oftalmopati eşlik eden ve etmeyen Graves hastaları) rs3761548 AC ve AA genotipi ile rs3761549 CT genotipi sıklığı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti (tümü $p < 0,05$). Hasta grubu ile kontrol grubu arasında rs3761547 açısından genotipik ve alelik dağılım farklılıkları gözlenmedi (tümü için $p > 0,05$). GO ve oftalmopati eşlik etmeyen GH grupları arasında her üç *FOXP3* TNP'sinin allel ve genotip sıklığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (hepsi $p > 0,05$).

Cite this article as: Yaylıoğlu Tuncay F, Serbest Ceylanoğlu K, Güntekin Ergün S, Tarlan B, Konuk O. The Role of *FOXP3* Polymorphisms in Graves' Disease with or without Ophthalmopathy in a Turkish Population.

Türk J Ophthalmol 2024;54:69-75

Bu çalışma 3-7 Kasım 2021 tarihlerinde Antalya'da, 55. Türk Oftalmoloji Derneği Ulusal Kongresi'nde sunulmuştur.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Fulya Yaylıoğlu Tuncay, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

E-posta: drfulyatuncay@gmail.com ORCID-ID: orcid.org/0000-0002-2088-3416
Geliş Tarihi/Received: 15.12.2023 Kabul Tarihi/Accepted: 20.03.2024

DOI: 10.4274/tjo.galenos.2024.37897

Sonuç: Türk toplumunda GH gelişimi için muhtemel risk faktörleri olarak rs3761548 (-3279) AC ve AA genotipleri ile rs3761549 (-2383 C/T) CT genotipi gösterildi. Bununla birlikte, üç TNP'den hiçbirinin GH'de GO gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilemedi.

Anahtar Kelimeler: Forkhead box P3, Graves hastalığı, Graves oftalmopatisi, tek nükleotid polimorfizmleri

Abstract

Objectives: Forkhead box P3 (*FOXP3*) gene polymorphisms have been evaluated in many autoimmune diseases, including Graves' disease (GD), in different populations. However, those polymorphisms have not been analyzed in GD or Graves' ophthalmopathy (GO) in the Turkish population. In this study, we aimed to evaluate the frequency of *FOXP3* polymorphisms in GD with or without ophthalmopathy in a Turkish population.

Materials and Methods: The study included 100 patients with GO, 74 patients with GD without ophthalmopathy, and 100 age- and sex-matched healthy controls. In all study participants, rs3761547 (-3499 A/G), rs3761548 (-3279 C/A), and rs3761549 (-2383 C/T) single nucleotide polymorphisms (SNPs) were detected using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method. The chi-square test was used to evaluate genotype and allele frequencies. Odds ratios and 95% confidence intervals were calculated for genotype and allele risks.

Results: In the patient group (including GD with or without ophthalmopathy), the rs3761548 AC and AA genotype and rs3761549 CT genotype were significantly more frequent than in the control group (all $p < 0.05$). No genotypic and allelic differences were observed for rs3761547 between the patient and control groups (all $p > 0.05$). There was no statistically significant difference between the GO and GD without ophthalmopathy groups concerning the allele and genotype frequencies of all three *FOXP3* SNPs (all $p > 0.05$).

Conclusion: The AC and AA genotypes of rs3761548 (-3279) and CT genotype of rs3761549 (-2383 C/T) were shown to be possible risk factors for GD development in the Turkish population. However, none of the three SNPs was shown to be associated with the development of GO in patients with GD.

Keywords: Forkhead box P3, Graves' disease, Graves' ophthalmopathy, single nucleotide polymorphisms

Giriş

Graves hastalığı (GH) tiroid bezinde diffüz büyüme ve hipertiroidiye neden olan, tiroid spesifik otoantikor düzeylerinin yükseldiği bir otoimmün hastalıktır. GH kadınlarda daha sık olmak üzere genellikle 20-40 yaşları arasında görülür.^{1,2} GH hastalarının %50'sine kadarlık bölümünde orbital yapıları tutan başka bir otoimmün hastalık olan Graves oftalmopatisi de (GO) gelişir.³ GO'nun klinik şiddeti değişkendir ve Avrupa Graves Oftalmopati Grubu (EUGOGO) sınıflamasına göre değerlendirilir.³

Tiroid stimulan hormon reseptörünün (TSHR) GH'de olduğu gibi GO'da da ana otoantijen olduğu gösterilmiştir.⁴ Her iki hastalık da genetik ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimleri içeren karmaşık bir patogeneze sahiptir.⁵ Genetik faktörlerden *CTLA-4*, *TSHR*, *Tg*, *CD40* ve *PTPN22* polimorfizmleri ile HLA sınıf II gen varyantlarının GO ve GH arasında ortak risk faktörü olduğu gösterilmiştir.⁶ Ancak, *IL1A* geninde bir polimorfizmin, GO'nun eşlik etmediği GH hastalarına kıyasla GH'de GO gelişimini desteklediği bulunmuştur.⁷ Ek olarak, Polonya popülasyonunda yapılan başka bir çalışma, bir *VDR* polimorfizminin GO'nun gelişimine katkıda bulunabileceğini göstermiştir.⁸ Klinik açıdan bakıldığında, GH hastaları arasında GO gelişme riski daha yüksek olanları belirleyebilmek önemlidir ve halen güvenilir genetik risk faktörlerinin tanımlanmasına gereksinim vardır.

Bağıışıklık sistemi primer olarak düzenleyici T-hücreleri (Treg'ler) tarafından kontrol edilmektedir.⁹ Treg'lerin, GH ve GO dahil olmak üzere insan otoimmün hastalıklarının patogenezinde önemli faktörler olduğu gösterilmiştir.^{10,11,12} Forkhead box P3 (*FOXP3*) geni X kromozomunda yer alır ve protein ürünü FoxP3, ağırlıklı olarak Treg'lerde bir transkripsiyon faktörü olarak ifade edilir. FoxP3 eksikliği Treg'lerin immünosupresif etkisini bozarak otoimmün hastalıklara yol açabilir.^{13,14} Farklı popülasyonlarda *FOXP3* polimorfizmleri ile GH gelişimi arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir.^{10,13,15,16,17,18,19,20,21,22} Yedi olgu kontrol çalışmasının yakın tarihli bir meta-analizine göre, *FOXP3* polimorfizmi rs3761548 Asyalılarda ve rs3761549 Asyalılarda ve beyazlarda GH duyarlılığı ile ilişkilendirilmiştir.¹⁵ *FOXP3* tek nükleotid polimorfizmleri (TNP) ile GH duyarlılığı arasındaki ilişki ile bazı çalışmalar yapılmış olmasına rağmen, Türk popülasyonunda bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca, sadece GO hasta sayısı sınırlı olan iki çalışmada, GH hastalarında *FOXP3* TNP'leri ile GO riski arasındaki ilişkiyi araştırılmıştır.^{13,17} Bu nedenle çalışmamız Türk GH hastalarında *FOXP3* genindeki üç TNP'yi (-2383 C/T, -3279 C/A ve -3499 A/G) araştırarak ilk çalışmadır. Ek olarak, bu TNP'lerden birinin GO gelişimini destekleyip desteklemediğini daha büyük bir GH hasta popülasyonunda değerlendirdik.

Gereç ve Yöntem

Hastalar

Bu prospektif olgu-kontrol çalışması Ocak 2019-Ocak 2022 tarihleri arasında yapıldı ve çalışmaya 174 GH hastası (GO

görülmeyen 74 ve GO görülen 100) ve 100 sağlıklı kontrol dahil edildi. GH tanısı Amerikan Klinik Endokrinologlar Derneği Kılavuzları'na göre Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından konuldu.²³ Tanı kriterleri arasında hipertiroidizm, tirotropin reseptör antikor seviyesinin yüksek olması ve tipik tiroid ultrason görünümü vardı. Oftalmopati varlığı üç göz hekimi (K.S.C., B.T. ve O.K.) tarafından değerlendirildi ve şiddeti EUGOGO sınıflamasına göre belirlendi.³ GO görülmeyen gruba en az 5 yıldır GH tanısı olan ve oftalmopatisi olmayan olgular dahil edildi. Sağlıklı kontrol grubu, GH, alerjik hastalık veya diğer otoimmün hastalık öyküsü olmayan yaş ve cinsiyet uyumlu bireylerden oluşturuldu. Hastane kayıtlarından başlangıç yaşı, hastalık süresi, sigara içme durumu ve ailede GH öyküsü toplandı.

Örnekler toplamadan önce tüm katılımcılardan yazılı bilgilendirilmiş onam alındı. Çalışma protokolü için, Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı (karar no: 2018-824/1, tarih: 12.11.2018). Çalışma Helsinki Bildirgesi'nin ilkelerine bağlı kalınarak gerçekleştirildi.

Örneklerin Toplanması ve Genotipleme

Genotipleme için hastalardan ve sağlıklı kontrollerden etilendiamin tetraasetik asit içeren tüplere dört mililitre periferik kan alındı. Genomik DNA, QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, ABD) kullanılarak izole edildi. *FOXP3* geninde rs3761548, rs3761549 ve rs3761547 genotipleri (gen no: 50943, Xp11.23) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve takiben restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (RFLP) tayini ile belirlendi.

PCR için 50 ng genomik DNA, 2 mM MgCl₂ içeren 1x PCR tamponu (Thermo Scientific™-Thermo Fisher Scientific Inc., ABD), 0,4 µmol primer (IDT-Integrated DNA Technologies, Inc., ABD), 0,20 mM dNTP (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific Inc., ABD) ve 1 U DNA polimeraz (Thermo Scientific™-Thermo Fisher Scientific Inc., ABD) kullanılarak toplam 25 µL'lik reaksiyon hazırlandı. Standart PCR protokolünde ilk adım, DNA'nın 95 °C'de 5 dakika denatüre edilmesi, ardından 35 döngü 30 saniye 94 °C'de denatürasyon, 30 saniye 59 °C (rs3761547 ve rs376154859 °C) veya 60 °C'de (rs3761549) primer bağlanması ve 30 saniye 72 °C'de uzamadır. RFLP için 10 µL PCR ürünü kullanıldı. Restriksiyon enzimi Pst1 (New England Biolabs GmbH, Almanya) rs3761547 için (16 saat boyunca 37 °C'de 1 U), BseN1 (BsrI) (New England Biolabs GmbH, Almanya) rs3761548 için (16 saat boyunca 65 °C'de 1 U) ve PvuII (New England Biolabs GmbH, Almanya) rs3761549 için (16 saat boyunca 37 °C'de 1 U) kullanıldı. Parçalanmamış ve parçalanmış PCR ürünleri %3'lük agaroz jelde elektroforez ile analiz edildi. Deneyde kullanılan primerler ve restriksiyon enzimleri ile parçalanmadan önceki ve sonraki ürün boyutları Tablo 1'de gösterildi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel veriler SPSS 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) kullanılarak analiz edildi. Normal dağılım gösteren değişkenler için Student's t-testi, kategorik değişkenler (cinsiyet, aile öyküsü) için ki-kare testi kullanıldı. TNP'lerin Hardy-

Tablo 1. *FOXP3* primerleri

Pozisyon	Enzim	İleri primer (5'→3') Ters primer (3'→5')	Amplikon boyutu	RFLP paterni
-2383 C/T, rs3761549	BsrI	gcctggcactctcagagcttcaa cgacaccacggaggaagagaaga	487 bp	CC-329bp, 15 bp AC-487bp, 329bp, 158bp AA-48bp
-3279 C/A, rs3761548	PstI	ccctccgtgctcagtgtag gcctcagccttcgccaata	261 bp	CC-184bp, 127bp, 77bp CT-261bp, 184bp, 127bp, 77bp TT-261bp, 127bp
-3499 A/G, rs3761547	PvuII	gcaatcctcctcgcacac tcagggttcagttgacag	158 bp	AA-158bp AG-158bp, 123 bp, 35 bp GG-123 bp, 35 bp

FOXP3: Forkhead box P3, RFLP: Restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi

Weinberg dengesi (HWE) ile uyumlu olup olmadığı ki-kare testi ile hesaplandı. Hasta ve kontrol gruplarındaki polimorfizmlerin genotip ve allel frekans dağılımlarının karşılaştırılmasında yine ki-kare testi kullanıldı. Belirli genotipler ve aleller için %95 güven aralıkları (GA) ile olasılık oranlarını ("odds ratio", OR) belirlemek için lojistik regresyon analizi yapıldı. İstatistiksel açıdan p değerinin 0,05'ten küçük olması anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Katılımcıların Özellikleri

Çalışmaya 100 GO'lu ve 74 GO'suz GH hastası ve 100 kontrol dahil edildi. Gruplar arasında yaş ve cinsiyet dağılımı açısından anlamlı fark yoktu. Kontrol grubunun yaş ortalaması $36,1 \pm 12$ yıl, çalışma grubunun yaş ortalaması $37 \pm 12,6$ yıl idi ($p=0,33$). Erkek ve kadın oranları sırasıyla GO görülmeyen GH grubunda %24,3 ve %75,7, GO görülen GH grubunda %26,0 ve %74,0 ve kontrol grubunda ise %32,0 ve %68,0 idi ($p=0,48$) (Tablo 2).

FOXP3 TNP Allel ve Genotip Frekansları

İncelenen üç *FOXP3* polimorfizminin hasta (GO görülen ve görülmeyen) ve kontrol gruplarında allelik ve genotipik frekanslarının dağılımı ve GH riski ile ilişkileri Tablo 3'de özetlenmiştir. Kontrollerde, tüm TNP'lerin dağılımı HWE ile uyumluydu (rs3761547, $p=0,871$; rs3761548, $p=0,126$; ve rs3761549, $p=0,068$). Hasta grubunda rs3761547 ($p=0,992$) ve rs3761548 ($p=0,143$) HWE ile uyumlu iken, rs3761549 dağılımı HWE ile uyumlu değildi ($p=0,036$).

Rs3761547 için AA, AG ve GG genotiplerinin frekansları GH hastalarında sırasıyla 147 (%84,5), 26 (%15) ve 1 (%0,5) iken kontrol grubunda ise 90 (%90), 10 (%10) ve 0 (%0) idi. Yapılan istatistiksel analizde *FOXP3* rs3761547 polimorfizminin allel ve genotip dağılımının GH hastalarında ve kontrollerde anlamlı farklılık göstermediği görüldü (sırasıyla; $p=0,23$ ve $p=0,17$) (Tablo 3).

Rs3761548 için CC, CA ve AA genotiplerinin frekansları hasta grubunda (GO görülen ve görülmeyen) sırasıyla; 50 (%28,7), 74 (%42,5) ve 50 (%28,7) iken, kontrol grubunda 66 (%66), 26 (%26) ve 8 (%8) idi. Hastalar ve sağlıklı kontroller arasında genotiplerin dağılımı anlamlı farklılık gösterdi ($p<0,0001$). Kontrol grubunda en yaygın genotip olan CC referans alındığında CA genotipinin daha yüksek GH riski ile ilişkili olduğu bulundu (OR: 3,8; %95 GA: 2,1-6,7). Ayrıca, A allelinin sıklığı hastalarda kontrollere göre anlamlı düzeyde yüksekti (%50'ye kıyasla %21, $p<0,0001$), bu da A alleli taşıyıcılarında GH gelişmesi riskinin anlamlı düzeyde arttığını göstermektedir (OR: 3,8; %95 GA: 2,5-5,6) (Tablo 3).

Rs3761549 için, CC, CT ve TT genotiplerinin frekansları hasta grubunda (GO görülen ve görülmeyen) sırasıyla; 131 (%75,3), 35 (%20,1) ve 8 (%4,6) iken, kontrol grubunda 88 (%88), 10 (%10) ve 2 (%2) idi. Genotipik dağılım GH hastaları ile sağlıklı kontroller arasında anlamlı farklılık gösterdi ($p=0,02$). Kontrol grubunda en yaygın genotip (CC) referans olarak kullanıldığında, CT genotipinin daha yüksek GH riski ile ilişkili olduğu bulundu (OR: 2,3; %95 GA: 1,1-4,9). Ek olarak, T allelinin sıklığı hastalarda kontrollere göre anlamlı düzeyde yüksekti (%14,7'ye kıyasla %7, $p=0,007$), bu da T alleli

Tablo 2. Grupların demografik özellikleri

Değişkenler	GO görülmeyen n=74	GO n=100	Kontrol n=100	p değeri
Hastalığın başlangıç yaşı (ortalama $\pm$ SD)	35,5 $\pm$ 12,1	37,8 $\pm$ 12,4	-	0,66
Cinsiyet, n kadın/erkek	56/18	74/26	68/32	0,48
Hastalık süresi (yıl), ortalama $\pm$ SD	9,1 $\pm$ 3,0	6,7 $\pm$ 5,2	-	0,15
Aile öyküsü (pozitif/negatif)	38/36	58/42	-	0,42

GO: Graves oftalmopatisi, SD: Standart deviasyon

Tablo 3. Çalışma ve kontrol grubunun genotipik ve allelik dağılımı

Genotip	Kontrol grubu n=100	Çalışma grubu (GO görülen + görülmeyen) n=174	p değeri	OR (%95 GA)
rs3761548 (-3279 C/A)				
CC	66 (%66)	50 (%28,7)	-	1,0 ^a
AC	26 (%26)	74 (%42,5)	<0,0001	3,8 (2,1-6,7)
AA	8 (%8)	50 (%28,7)	<0,0001	8,25(3,6-18,9)
Allel				
C	158 (%79)	174 (%50)	-	1,0 ^a
A	42 (%21)	174 (%50)	<0,0001	3,8 (2,5-5,6)
rs3761549 (-2383 C/T)				
CC	88 (%88)	131 (%75,3)	-	1,0 ^a
CT	10 (%10)	35 (%20,1)	0,02	2,3 (1,1-4,9)
TT	2 (%2)	8 (%4,6)	0,3	8,25 (0,5-12,9)
Allel				
C	186 (%93)	297 (%85,3)	-	1,0 ^a
T	14 (%7)	51 (%14,7)	0,007	2,3 (1,2-4,2)
rs3761547 (-3499 A/G)				
AA	90 (%90)	147 (%84,5)	-	1,0 ^a
AG	10 (%10)	26 (%15)	0,23	1,58 (0,73-3,43)
GG	0	1 (%0,5)	-	-
Allel				
A	190 (%95)	320 (%92)	-	1,0 ^a
G	10 (%5)	28 (%8)	0,17	1,67 (0,73-3,43)

^aListelenen ilk alel/genotip referans değer olarak kabul edildi, istatistiksel anlamlı olan değerler koyu renkle belirtildi. Genotip ve allel frekansları ki kare testi ile karşılaştırıldı
GO: Graves oftalmopatisi, OR: Odds oranı, n: Sayı, GA: Güven aralığı

taşıyıcılarının GH gelişimi açısından anlamlı risk taşıdığını göstermektedir (OR: 2,3; %95 GA: 1,2-4,2) (Tablo 3).

GO görülen ve görülmeyen gruplar arasında üç *FOXP3* TNP'nin genotipik ve allelik dağılımları karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 4). Ayrıca *FOXP3* genotipleri (-2383 C/T ve -3279 C/A) ile demografik değişkenler arasındaki ilişki de analiz edildi. Araştırılan *FOXP3* polimorfizmleri ile hastaların yaşı, aile öyküsü, cinsiyeti veya sigara içme durumu arasında ilişki saptanmadı (Tablo 5).

Tartışma

FoxP3 ağırlıklı olarak CD34+ CD25 Treg'lerde ifade edilir ve Treg'lerin baskılayıcı işlevlerini sürdürmelerinde kritik bir rol oynar.^{13,14} *FOXP3* genindeki genetik varyasyonlar, Treg'lerin baskılayıcı işlevlerini zayıflatarak ve otoimmün yanıtları artırarak GH patogeneğinde rol oynamaktadır.^{15,16,20} *FOXP3* genindeki TNP'ler ile GH arasındaki ilişki, farklı popülasyonlarda yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olsa da, bugüne kadar yapılan az sayıda çalışma, orbitopatisi olan ve olmayan GH hastalarında *FOXP3* TNP sıklığını karşılaştırmıştır.^{13,17} Bu çalışma, Türk hastalardan oluşan bir popülasyonda *FOXP3* geninde yaygın görülen üç polimorfizm (rs3761549 [-2383 C/T], rs3761548 [-3279 G/T] ve

rs3761547 [-3499 T/C]) ile GH arasındaki ilişkiyi araştıran ilk çalışmadır. Sonuçlar, -3279'un AC ve AA genotiplerinin ve -2383'ün CT genotipinin GH için olası risk faktörleri olduğunu göstermiştir. Ancak bizim çalışma popülasyonumuzda GH hastalarında GO gelişimi araştırılan *FOXP3* polimorfizmleri ile ilişkilendirilememiştir.

Literatürde -3279 polimorfizminin AA ve AC genotipleri ile sistemik lupus eritematozus ve vitiligo gibi otoimmün hastalıklar arasında ilişki olduğu gösterilmiştir.^{10,12} Literatürde GH ilişkisi etnik kökene göre farklılık göstermektedir. Genotipik farklılıklar olmasına rağmen, -3279 polimorfizminin Asya popülasyonunda GH için bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir.^{10,13,17,19,21,22} Kaşmir popülasyonunda -3279 AC genotipinin, Çin Han popülasyonunda -3279 AA ve AC genotiplerinin ve Güneybatı Çin Han popülasyonunda -3279 AA genotipinin GH için risk oluşturduğu kaydedilmiştir.^{13,19,22} Ayrıca yüksek tiroid stimulan hormon (TSH) düzeyi veya düşük TSHR düzeyi olan hastalarda A alleli yüksek sıklıkta bildirilmiştir.²¹ Birçok çalışmada olduğu gibi çalışmamızda da GH grubunda A alleli daha sık gözlenmiştir.^{13,17,21} Beyaz ırkta -3279 polimorfizminin risk faktörü olduğunu bildiren çalışma bulunmamaktadır.^{18,20} Çalışma popülasyonumuzda, Kaşmir ve Polonya popülasyonlarına benzer şekilde, genotip dağılımı erkekler ve kadınlar arasında anlamlı farklılık göstermemiştir

Tablo 4. GO görülen ve görülmeyen hastaların genotipik ve allelik dağılımı				
Genotip	GO görülmeyen n=74	GO görülen n=100	p değeri	OR (%95 GA)
-3279 C/A				
CC	18 (%24,3)	32 (%32)	0,26	1,38 (0,7, 2,72)
AC	34 (%45,9)	40 (%40)	0,43	0,8 (0,44, 1,47)
AA	22 (%29,7)	28 (%28)	0,80	0,92 (0,47, 1,78)
Allel			0,38	1,21 (0,79, 1,85)
A	78 (%47,3)	96 (%48)		
C	70 (%52,7)	104 (%52)		
-2383 C/T				
CC	58 (%78,4)	73 (%73)	0,41	0,75 (0,37, 1,51)
CT	10 (%13,5)	25 (%25)	0,61	2,13 (0,95, 4,77)
TT	6 (%8,1)	2 (%2)	0,06	0,23 (0,05, 1,18)
Allel			0,71	0,89 (0,49, 1,63)
C	116 (%84)	171 (%85,5)		
T	22 (%16)	29 (%14,5)		
-3499 A/G				
AA	62 (%83,8)	85 (%85)	0,82	1,1 (0,48, 2,51)
AG	12 (%16,2)	14 (%14)	0,70	0,16 (0,06, 0,43)
GG	0	1 (%1)	-	-
Allel			0,75	1,13 (0,52, 2,46)
A	156 (%82,9)	184 (%92)		
G	12 (%7,1)	16 (%8)		
Genotip ve allel frekansları ki kare testi ile karşılaştırıldı GO: Graves oftalmopatisi, OR: Odds oranı, n: Sayı, GA: Güven aralığı				

Tablo 5. <i>FOXP3</i> genotipleri ile çalışma grubunun (GO görülen ve görülmeyen) demografik özellikleri arasındaki ilişkinin analizi						
Özellik	<i>FOXP3</i> -2383 C/T			<i>FOXP3</i> -3279 C/A		
	CC (n=131)	CT+TT (n=43)	p	CC (n=50)	AC+AA (n=124)	p
Başlangıç yaşı			0,11			0,49
≤40 yıl	76 (%58)	31 (%72,1)		33 (%66)	17 (%34)	
>40 yıl	55 (%42)	12 (%27,9)		74 (%59,7)	50 (%40,3)	
Cinsiyet			0,42			0,57
Kadın	100 (%76,3)	30 (%69,8)		39 (%30)	91 (%70)	
Erkek	31 (%23,7)	13 (%30,2)		11(%25)	33 (%75)	
Aile öyküsü			0,48			0,87
Pozitif	70 (%53,4)	26 (%60,5)		27 (%28,1)	69 (%71,9)	
Negatif	61 (%46,6)	17 (%39,5)		23 (%29,5)	70,5 (%55)	
Sigara			0,48			>0,99
Var	73 (%77,7)	21 (%22,3)		26 (%52)	63 (%48)	
Yok	58 (%72,5)	22 (%27,5)		24 (%50,8)	61 (%49,2)	
Genotip frekansları ki kare testi ile karşılaştırıldı GO: Graves oftalmopatisi, <i>FOXP3</i> : Forkhead box P3						

(Tablo 5).^{17,20} Ancak, Asya popülasyonunda, genotip dağılımının erkekler ve kadınlar arasında farklı olduğu bildirilmiştir.^{13,22}

Polimorfizm -2383'ün GH duyarlılığını polimorfizm -3279'e benzer şekilde artırdığı bildirilmiştir.^{13,17,18,20} Bossowski ve ark.²⁰, beyaz ırkta -2383 polimorfizminin CT genotipinin sağlıklı kadınlarda daha yaygın olduğunu bildirmiştir. Shehjar ve ark.¹⁷ -2383 polimorfizminin TT genotipinin Kaşmir popülasyonunda GH gelişimi için bir risk faktörü olduğunu, ancak allelik veya genotipik frekans dağılımında cinsiyet farkı olmadığını bildirmişlerdir. Çin Han popülasyonunda yapılan başka bir çalışmada, -2383 TT genotipi taşıyıcılarında, serbest triiyodotironin seviyelerinin CC/CT genotiplerine göre daha yüksek olduğu bildirilmiş, ancak genotip frekansları açısından GH ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.¹³ Çalışmamızda GH gelişimi ile -2383 CT genotipi arasında ilişki saptadık ve çalışma grubunda T alleli anlamlı olarak daha sıkı. Ancak çalışma popülasyonumuzda genotip dağılımı erkekler ve kadınlar arasında anlamlı farklılık göstermedi (Tablo 5). Çalışmalarda GH ile allelik ve genotipik ilişkiler arasındaki farklılıklar etnik köken farkları ile açıklanabilir.

Polimorfizm -3449 açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.^{10,13,17,20,21,22} Literatürde sadece bir çalışmada, serbest triiyodotironin ve tiroksin seviyeleri ve -3499 A/G polimorfizminin GH ile ilişkili olduğunu bildirilmiştir.²⁰ Polimorfizm -3499'un *FOXP3* ekspresyonunu değiştirmediği ve Treg fonksiyonlarını etkilemediği sonucuna varılabilir.

Çalışma popülasyonumuzda GO hastası sayısı daha fazla olmasına rağmen *FOXP3* genotipleri veya allellerinin hiçbirisi GO ile ilişkili bulunmamıştır. Benzer şekilde, Zheng ve ark.¹³ ve Shehjar ve ark.¹⁷ Asya popülasyonlarında GH'de *FOXP3* TNP'leri ile oftalmopati arasında herhangi bir ilişki gösterememiştir. Aydın ve ark.²⁴ GH hastalarında endotelin reseptör tip A (*EDNRA*) C+70G geni ile oftalmopati gelişimi arasında ilişki saptamışlardır. Başka bir çalışmada *CD74*teki yeni TNP'lerin (rs2569103'ün AG genotipi) adiposit proliferasyonunu ve farklılaşmasını etkileyerek GO gelişme riskini artırdığı bildirilmiştir.²⁵ GH'de oftalmopati riski hakkında hala cevaplanmamış birçok soru bulunmaktadır. Oftalmopati gelişiminin daha iyi anlaşılması için hem genetik hem de genetik olmayan faktörler değerlendirilmelidir.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. İlk olarak, her gruptaki katılımcı sayısı sınırlıydı, bu da araştırmanın gücünü azaltmış ve cinsiyet ve orbitopati varlığı gibi alt gruplar arasında mevcut olabilecek anlamlı farklılıkları göstermemizi engellemiş olabilir. İkincisi, çalışma Türkiye'deki GH hastalarının sadece küçük bir bölümünü kapsamaktadır. Bu nedenle, sonuçlarımızın Türk popülasyonuna genellenip genellenemeyeceği belirsizdir. Üçüncüsü, çalışma popülasyonunun sınırlı olması nedeniyle haplotip analizi yapılamamıştır. Dördüncüsü, çalışma tasarımıımızın boylamsal olmamasıdır ve çalışma gruplarında GH hastalarında GH gelişme riskini etkileyebilecek GH ile ilgili diğer faktörleri kontrol edemedik.

Sonuç

Bu çalışma, Türk popülasyonundan bir örneklemede *FOXP3* polimorfizmleri ile GO'nun eşlik ettiği ve etmediği GH arasındaki ilişkiyi araştıran ilk çalışmadır. Çalışma popülasyonumuzda -3279 AC ve AA genotiplerinin ve -2383 CT genotipinin GH gelişimi için risk faktörü olabileceğini gösterdik. Ancak, *FOXP3* TNP'leri ile GH'de GO gelişimi arasında ilişki bulamadık. Daha büyük popülasyon çalışmaları veya mevcut verilerin meta-analizi, *FOXP3* polimorfizmlerinin GH'li hastalarda GO gelişme riski üzerindeki etkisini ortaya koyabilir.

Etik

Etik Kurul Onayı: Çalışma protokolü için, Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı (karar no: 2018-824/1, tarih: 12.11.2018).

Hasta Onayı: Alınmıştır.

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: K.S.C., B.T., O.K., Konsept: F.Y.T., K.S.C., S.G.E., O.K., Dizayn: F.Y.T., K.S.C., S.G.E., O.K., Veri Toplama veya İşleme: F.Y.T., K.S.C., S.G.E., Analiz veya Yorumlama: F.Y.T., K.S.C., S.G.E., Literatür Arama: F.Y.T., K.S.C., Yazan: F.Y.T., K.S.C., S.G.E.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (proje numarası: 01/2019-10).

Kaynaklar

1. Wémeau JL, Klein M, Sadoul JL, Briet C, Vélayoudom-Céphise FL. Graves' disease: Introduction, epidemiology, endogenous and environmental pathogenic factors. Ann Endocrinol (Paris). 2018;79:599-607.
2. Falgarone G, Heshmati HM, Cohen R, Reach G. Mechanisms in endocrinology. Role of emotional stress in the pathophysiology of Graves' disease. Eur J Endocrinol. 2012;168:13-18.
3. Bartalena L, Baldeschi L, Dickinson AJ, Eckstein A, Kendall-Taylor P, Marcocci C, Mourits MP, Perros P, Boboridis K, Boschi A, Currò N, Daumerie C, Kahaly GJ, Krassas G, Lane CM, Lazarus JH, Marinò M, Nardi M, Neoh C, Orgiazzi J, Pearce S, Pinchera A, Pitz S, Salvi M, Sivelli P, Stahl M, von Arx G, Wiersinga WM. Consensus statement of the European group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) on management of Graves' orbitopathy. Thyroid. 2008;18:333-346.
4. Bahn RS. Current Insights into the Pathogenesis of Graves' Ophthalmopathy. Horm Metab Res. 2015;47:773-778.
5. Burch HB, Cooper DS. Management of Graves Disease: A Review. JAMA. 2015;314:2544-2554.
6. Lee HJ, Stefan-Lifshitz M, Li CW, Tomer Y. Genetics and epigenetics of autoimmune thyroid diseases: Translational implications. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2023;37:101661.
7. Wong KH, Rong SS, Chong KK, Young AL, Pang CP, Chen LJ. Genetic Associations of Interleukin-related Genes with Graves' Ophthalmopathy: a Systematic Review and Meta-analysis. Sci Rep. 2015;5:16672.
8. Maciejewski A, Kowalczyk MJ, Herman W, Czyżyk A, Kowalska M, Żaba R, Łacka K. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Autoimmune Thyroiditis: Are They Associated with Disease Occurrence and Its Features? Biomed Res Int. 2019;2019:8197580.
9. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annu Rev Immunol. 2004;22:531-562.

10. Yu M, Tan X, Huang Y. Foxp-3 variants are associated with susceptibility to Graves' disease in Chinese population. *Eur J Inflamm*. 2017;15:113-119.
11. Saitoh O, Nagayama Y. Regulation of Graves' hyperthyroidism with naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells in a mouse model. *Endocrinology*. 2006;147:2417-2422.
12. Grant CR, Liberal R, Mieli-Vergani G, Vergani D, Longhi MS. Regulatory T-cells in autoimmune diseases: challenges, controversies and--yet--unanswered questions. *Autoimmun Rev*. 2015;14:105-116.
13. Zheng L, Wang X, Xu L, Wang N, Cai P, Liang T, Hu L. Foxp3 gene polymorphisms and haplotypes associate with susceptibility of Graves' disease in Chinese Han population. *Int Immunopharmacol*. 2015;25:425-431.
14. Georgiev P, Charbonnier LM, Chatila TA. Regulatory T Cells: the Many Faces of Foxp3. *J Clin Immunol*. 2019;39:623-640.
15. Tan G, Wang X, Zheng G, Du J, Zhou F, Liang Z, Wei W, Yu H. Meta-analysis reveals significant association between *FOXP3* polymorphisms and susceptibility to Graves' disease. *J Int Med Res*. 2021;49:3000605211004199.
16. Li HN, Li XR, Du YY, Yang ZF, Lv ZT. The Association Between FoxP3 Polymorphisms and Risk of Graves' Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:392.
17. Shehjar F, Afroze D, Misgar RA, Malik SA, Laway BA. Association of FoxP3 promoter polymorphisms with the risk of Graves' disease in ethnic Kashmiri population. *Gene*. 2018;672:88-92.
18. Owen CJ, Eden JA, Jennings CE, Wilson V, Cheetham TD, Pearce SH. Genetic association studies of the *FOXP3* gene in Graves' disease and autoimmune Addison's disease in the United Kingdom population. *J Mol Endocrinol*. 2006;37:97-104.
19. Fathima N, Narne P, Ishaq M. Association and gene-gene interaction analyses for polymorphic variants in *CTLA-4* and *FOXP3* genes: role in susceptibility to autoimmune thyroid disease. *Endocrine*. 2019;64:591-604.
20. Bossowski A, Borysewicz-Sańczyk H, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Zasim A, Szalecki M, Wikiera B, Barg E, Myśliwiec M, Kucharska A, Bossowska A, Gościk J, Ziara K, Górska M, Krętownski A. Analysis of chosen polymorphisms in FoxP3 gene in children and adolescents with autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity*. 2014;47:395-400.
21. Inoue N, Watanabe M, Morita M, Tomizawa R, Akamizu T, Tatsumi K, Hidaka Y, Iwatani Y. Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of *FOXP3* with prognosis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol*. 2010;162:402-406.
22. Tan G, Zheng G, Li J, Zhu Y, Liang Z, Li H, Yu H, Wang X. Association of genetic variations in FoxP3 gene with Graves' disease in a Southwest Chinese Han population. *Immun Inflamm Dis*. 2023;11:e1046.
23. Bahn Chair RS, Burch HB, Cooper DS, Garber JR, Greenlee MC, Klein I, Laurberg P, McDougall IR, Montori VM, Rivkees SA, Ross DS, Sosa JA, Stan MN; American Thyroid Association; American Association of Clinical Endocrinologists. Hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis: management guidelines of the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologists. *Thyroid*. 2011;21:593-646. Erratum in: *Thyroid*. 2011;21:1169. Erratum in: *Thyroid*. 2012;22:1195.
24. Aydın AE, Develi-İş S, Doğru-Abbasoğlu S, Vural P, Özderya A, Karadağ B, Uysal M. Polymorphisms of endothelin 1 (G5665T and T-1370G) and endothelin receptor type A (C+70G and G-231A) in Graves' disease. *Int Immunopharmacol*. 2014;18:198-202.
25. Liu YH, Shen CY, Tsai FJ. Association of variant on the promoter of cluster of differentiation 74 in graves disease and graves ophthalmopathy. *Biosci Rep*. 2020;40:BSR20202072.