

Hanna Mikoś

**Czynniki prozapalne, proapoptotyczne i antyapoptotyczne
w patogenezie autoimmunologicznej choroby tarczycy**



Rozprawa doktorska

Promotor

Prof. dr hab. n. med. Marek Niedziela

Pracownia Endokrynologii Molekularnej

Klinika Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej

II Katedra Pediatrii

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. n. med. Marek Niedziela

Projekt finansowany był z badań statutowych Kliniki (UM 502-01-01104118-06037)

Poznań 2013

*Składam serdeczne podziękowania
mojemu Promotorowi - Panu Prof. Markowi Niedzieli
za podanie tematu rozprawy
oraz za wsparcie i cenne rady w trakcie powstawania pracy*

*Pracownikom Kliniki Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej
dziękuję za okazaną życzliwość i pomoc
oraz dziękuję wszystkim, którzy przyczynili się do powstania tej pracy*

*Rozprawę dedykuję mojej Rodzinie,
Dziękuję Mamie, Mężowi i Synom za cierpliwość i wsparcie*

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	6
1. Wstęp	9
1.1. Autoimmunologiczna choroba tarczycy AITD	9
1.1.1. Przewlekłe autoimmunologiczne zapalenie tarczycy cAIT	10
1.1.2. Choroba Gravesa-Basedowa GD	10
1.2. Epidemiologia autoimmunologicznej choroby tarczycy	13
1.3. Etiopatogeneza autoimmunologicznej choroby tarczycy	13
1.3.1. Czynniki genetyczne	15
1.3.1.1. Geny odpowiedzi immunologicznej	17
1.3.1.1.1. MHC	17
1.3.1.1.2. CTLA-4	17
1.3.1.1.3. CD40	18
1.3.1.1.4. PTPN 22	18
1.3.1.2. Antygeny tarczycowe	19
1.3.1.2.1. TSHR	19
1.3.1.2.2. Tyreoglobulina i peroksydaza tarczycowa	19
1.3.2. Czynniki środowiskowe	22
1.3.2.1. Palenie tytoniu	22
1.3.2.2. Stres	22
1.3.2.3. Jod	22
1.3.2.4. Leki	23
1.3.2.4.1. Interferon α	23
1.3.2.4.2. Amiodaron	24
1.3.2.4.3. Lit	24
1.3.2.5. Zakażenia	24
1.4. Rola układu immunologicznego w patofizjologii AITD	26
1.5. Udział przeciwciał w patogenezie AITD	29
1.5.1. Przeciwciała ATPO i ATG	29
1.5.2. Przeciwciała TRAb	30
1.6. Zjawisko apoptozy	31
1.7. Rola apoptozy w patogenezie cAIT i GD	33
1.8. Udział cytokin w patomechanizmie autoimmunologicznej choroby tarczycy	36
1.8.1. Charakterystyka badanych cytokin	38
1.8.1.1. IL-6	38
1.8.1.2. IL-1 β	40
1.8.1.3. TNF- α	41

1.8.1.4. TRAIL	43
1.8.1.5. FasL.....	44
1.8.1.6. Układ cytokin OPG/RANKL	47
2. Założenia i cele pracy.....	49
2.1. Założenia pracy:.....	49
3. Pacjenci i metody zastosowane w pracy	50
3.1. Pacjenci	50
3.2. Wykonane badania	52
3.3. Badania laboratoryjne	54
3.3.1. Oznaczenia hormonalne.....	54
3.3.2. Oznaczenia przeciwciał przeciwtarczycowych	54
3.4. Metody oznaczania cytokin	58
3.5. Zastosowane metody analizy statystycznej danych	62
4. Wyniki.....	63
4.1. Charakterystyka badanych grup pacjentów.....	63
4.2. Porównanie badanych parametrów w badanych grupach dzieci - różnice i korelacje. 96	
4.3. Analiza krzywych ROC.....	121
4.4. Podsumowanie wyników	129
5. Dyskusja	132
6. Wnioski	151
7. Streszczenie.....	152
8. Summary.....	156
9. Piśmiennictwo	160
10. Spis tabel i rycin.....	180

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- ACTH - kortykotropina (ang. *Corticotropin*)
- APC - komórka prezentująca antygen (ang. *Antigen Presenting Cell*)
- Apo1 - receptor błonowy typu-1 (ang. *Apoptosis Antigen 1*)
- ATG - przeciwciała przeciw tyreoglobulinie (ang. *Anti-Thyroglobulin Antibodies*)
- ATPO - przeciwciała przeciw peroksydazie tarczycowej (ang. *Anti-Thyroid Peroxidase Antibodies*)
- Bad - białko proapoptotyczne z rodziny Bcl-2 (ang. *Bcl-2-Associated Death Promoter*)
- Bak - białko proapoptotyczne z rodziny Bcl-2 (ang. *Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer*)
- BAL - płukanie oskrzelowo-płucne (ang. *Bronchoalveolar Lavage*)
- Bax - białko proapoptotyczne z rodziny Bcl-2 (ang. *Bcl-2-Associated X Protein*)
- Bcl-2 - białko antyapoptotyczne (ang. *B-Cell Lymphoma 2*)
- Bcl-xl - białko antyapoptotyczne (ang. *B-Cell Lymphoma-Extra Large*)
- BMI - wskaźnik masy ciała (ang. *Body Mass Index*)
- cAMP - cykliczny adenozyńmonofosforan (ang. *Cyclic Adenosine Monophosphate*)
- CD - antygeny różnicowania (ang. *Cluster of Differentiation*)
- CG - gonadotropina kosmówkowa (ang. *Chorionic Gonadotropin*)
- Claudin - Klaudyna, białko połączenia międzykomórkowego (ang. *Claudin*)
- CLR - receptory lektynowe typu C (ang. *C-type Lectin Receptors*)
- CV - współczynnik zmienności (ang. *Coefficient of Variation*)
- DC - komórka dendrytyczna (ang. *Dendritic Cell*)
- DcR - białko rywalizujące z induktorami apoptozy (ang. *Decoy Receptor*)
- DISC - kompleks sygnałowy indukujący apoptozę (ang. *Death-Inducing Signaling Complex*)
- DIT - 3,5-dwujodotyrozyna (ang. *Diiodotyrosine*)
- DL - ligand śmierci (ang. *Death Ligand*)
- DNA - kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *Deoxyribonucleic acid*)
- DR - receptor śmierci (ang. *Death Receptor*)
- DZ - bliźnięta dwujajowe (ang. *Dizygotic Twins*)
- FADD - domena śmierci związana z Fas (ang. *Fas Associated Death Domain*),
- Fas - receptor błonowy indukujący apoptozę (ang. *Apoptosis-Inducing Receptor*)
- FasL - ligand indukujący apoptozę (ang. *Apoptosis-Inducing Ligand*)
- FCRL3 - białko regulujące przypominające receptor Fc (ang. *Fc Receptor-Like Protein 3*)
- FLICE - domena śmierci związana z Fas (ang. *Fas-Associated Death Domain Protein-Interleukin-1 beta-Converting Enzyme*)
- FSH - hormon folikulotropowy (ang. *Follikulotropin*)

FT3 - wolna trijodotyronina (ang. *Free Triiodothyronine*)

FT4 - wolna tyroksyna (ang. *Free Thyroxine*)

G-CSF - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*)

GD - choroba Gravesa-Basedowa (ang. *Graves' Disease*)

GO - orbitopatia tarczycowa w chorobie Gravesa-Basedowa (ang. *Graves Orbitopathy*)

HLA - ludzki antygen leukocytarny (ang. *Human Leukocyte Antigen*)

HT - choroba Hashimoto (ang. *Hashimoto's Thyroiditis*)

ICAM - białko adhezyjne międzykomórkowe (ang. *Intracellular Adhesion Molecule*)

IFN- α - interferon alfa (ang. *Interferon alfa*)

IFN- γ - interferon gamma (ang. *Interferon gamma*)

Ig G - immunoglobulina G (ang. *Immunoglobulin G*)

IL - interleukina (ang. *Interleukin*)

IL-2RA- antagonist receptoru interleukiny 2 (ang. *Interleukin-2 Receptor Antagonist*)

JAM - białko adhezyjne (ang. *Junctional Adhesion Molecule*)

LH - hormon luteinizujący (ang. *Lutropin*)

LPS - lipopolisacharydy (ang. *Lipopolysaccharides*)

LYP - cytoplazmatyczna fosfataza tyrozyny (ang. *Protein Tyrosine Phosphatase*)

MHC - główny antygen zgodności tkankowej (ang. *Major Histocompatibility Complex*)

MIT - monoiodotyrozyna (ang. *Monoiodotyrosine*)

MIZS - młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów

mRNA - informacyjny RNA (ang. *messenger RNA*)

MZ - bliźnięta jednojajowe (ang. *Monozygotic Twins*)

NADPH- dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (ang. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*),

NF κ B - czynnik jądrowy kappaB (ang. *Nuclear Factor kappaB*)

NHANES- Narodowe Badanie Odżywiania i Stanu Zdrowia (ang. *National Health and Nutrition Examination Survey*)

NK - naturalne komórki cytotoksyczne (ang. *Natural Killer cells*)

NO - tlenek azotu (ang. *Nitric Oxide*)

PG - prostaglandyna (ang. *Prostaglandin*)

PPT - poporodowe zapalenie tarczycy (ang. *Postpartum Thyroiditis*)

RAIDD- białko homologiczne domeny śmierci (ang. *Death Adaptor Molecule*)

RANK - receptor aktywujący czynnik jądrowy kappaB (ang. *Receptor Activator of NF-kappaB*)

RANKL- ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy kappaB (ang. *Receptor Activator of NF-kappaB Ligand*)

RBMI - wskaźnik Cole'a (ang. *Relative Body Mass Index*)
RIP - białko pośredniczące (ang. *Receptor-Interacting Protein*)
RZS - reumatoidalne zapalenie stawów
SAA - surowiczy amyloid A (ang. *Serum Amyloid A*)
SD - odchylenie standardowe (ang. *Standard Deviation*)
SDS - wielokrotność odchylenia standardowego właściwego dla danej populacji (ang. *Standard Deviation Score*)
sIL-6R - rozpuszczalny receptor interleukiny 6 (ang. *Soluble Interleukin 6 Receptor*)
SLE - toczeń rumieniowaty układowy (ang. *Systemic Lupus Erythematosus*)
TAO - orbitopatia tarczycowa (ang. *Thyroid-Associated Orbitopathy*)
TBAb - przeciwciała blokujące receptor tyreotropiny (ang. *Thyrotropin Blocking Antibodies*)
TG - tyreoglobulina (ang. *Thyroglobulin*)
TGF- β - transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *Transforming Growth Factor β*)
Th - limfocyt T pomocniczy (ang. *T-helper*)
TLR - receptory Toll podobne (ang. *Toll-like Receptors*)
TMB - tetrametylobenzydyna
TNFR - receptor dla czynnika martwicy guza (ang. *Tumor Necrosis Factor Receptor*)
TNF- α - czynnik martwicy guza alfa (ang. *Tumor Necrosis Factor α*)
TPO - enzym peroksydaza tarczycowa (ang. *Thyroid Peroxidase*)
TRAb - przeciwciała przeciwko receptorowi tyreotropiny (ang. *Thyrotropin Receptor Antibodies*)
TRADD- domena śmierci związana z receptorem TNF (ang. *TNFR-Associated Death Domain*)
TRAF-2- związany z TNFR- czynnik-2 (ang. *Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 2*)
Treg - limfocyty T regulatorowe (ang. *Regulatory T Cells*)
TSAb - przeciwciała stymulujące receptor tyreotropiny (ang. *Thyrotropin Stimulating Antibodies*)
TSH - tyreotropina, (ang. *Thyroid Stimulating Hormone, Thyrotropin*)
USG - ultrasonografia (ang. *Ultrasonography*)
VCAM-1- białko adhezyjne naczyniowe (ang. *Vascular Cell Adhesion Protein 1*)
ZO-1 - białko tworzące połączenia międzykomórkowe typu ścisłego (ang. *Tight Junction Protein*)

1. WSTĘP

Choroby autoimmunologiczne charakteryzują się przewlekłym przebiegiem z następującymi po sobie okresami zaostrzeń i remisji, które w konsekwencji mogą prowadzić do inwalidztwa, a nawet śmierci. Kluczową rolę w patogenezie pełnią antygeny jako integralne składowe komórki własnego organizmu, zwane autoantygenami oraz produkowane w celu ich eliminacji autoprzeciwciała. Choroba autoimmunologiczna stanowi nieprawidłowy, najczęściej specyficzny narządowo rodzaj odpowiedzi immunologicznej, skierowanej przeciwko własnym antygenom organizmu chorego. Obecnie na świecie na choroby autoimmunologiczne choruje ok. 5% ludności, z czego prawie 80% stanowią kobiety. W przeważającej części zidentyfikowano autoantygeny chorobotwórcze i znanych jest ponad 70 jednostek chorobowych o podłożu autoimmunologicznym. Na podstawie dostępnej wiedzy można stwierdzić, że choroby autoimmunologiczne są wynikiem wzajemnej interakcji pomiędzy kilkoma czynnikami sprawczymi: czynnikami środowiskowymi, patogenami, podatnością genetyczną, zaburzeniem procesów tolerancji immunologicznej wobec własnych antygenów, mechanizmami apoptozy. Nadal odkrywane są nowe autoantygeny przeciwko którym skierowana jest odpowiedź własnego układu immunologicznego^[1,2].

1.1. Autoimmunologiczna choroba tarczycy AITD

Autoimmunologiczna choroba tarczycy (AITD, *Autoimmune Thyroid Disease*) jest najczęstszą narządowo specyficzną chorobą autoimmunologiczną występującą u kobiet i mężczyzn, której wskaźnik rozpowszechnienia na świecie wzrasta wraz z wiekiem, w szczególności wśród kobiet. Podatność na choroby autoimmunologiczne tarczycy zależy od złożonej interakcji wielu czynników. AITD obejmuje kilka powiązanych ze sobą, klinicznie przeciwstawnych stanów chorobowych w tym: zapalenie tarczycy typu Hashimoto (HT) przebiegające z wolem, zanikowe autoimmunologiczne zapalenie tarczycy manifestujące się niedoczynnością tarczycy, poporodowe zapalenie tarczycy (PPT), nadczynność tarczycy w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa (GD) i orbitopatia tarczycowa (TAO). Spośród ww. chorób tarczycy choroba Hashimoto i choroba Gravesa-Basedowa występują najczęściej. Jedna postać choroby może przechodzić w inną, w zależności od postępu procesu autoimmunologicznego^[3,4,5].

1.1.1. Przewlekłe autoimmunologiczne zapalenie tarczycy cAIT

Przewlekłe limfocytarne zapalenie gruczołu tarczowego, wole limfocytarne lub choroba Hashimoto jest to najczęstszy rodzaj zapalenia tarczycy i najczęstsza przyczyna pierwotnej niedoczynności gruczołu tarczowego. W wyniku autoimmunizacji na własne antygeny u około 95% pacjentów stwierdza się w surowicy krwi obecność przeciwciał przeciwko tyreoglobulinie (ATG) oraz przeciwciała przeciwko peroksydazie tarczycowej (ATPO). Choroba często współistnieje z innymi chorobami autoimmunologicznymi jak cukrzyca typu 1, młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów, zespół Sjögrena, celiakia i inne^[6]. Jest wyraźnie częstsza u kobiet, niż u mężczyzn, a większość zachorowań odnotowuje się u osób w wieku 45-65 lat. W chorobie występuje predyspozycja rodzinna: u 50% członków rodziny chorego stwierdza się bowiem obecność przeciwciał przeciwotarczycowych. Wskazywano na możliwy związek mutacji w genie *HLADR5* z rodzinną predyspozycją do tej postaci zapalenia tarczycy. Wykazano związek z obecnością antygenów układu HLA-DR3, DR5, DR2, DQ1 i B8. Choroba Hashimoto jest główną przyczyną niedoczynności tarczycy u dzieci i młodzieży^[7]. W amerykańskiej populacji nastolatków w wieku od 11 do 18 lat w ciągu roku przypada pięć nowych zachorowań na 1000 nastolatków. Choroba występuje częściej wśród dziewcząt niż u chłopców. Rzadko występuje poniżej trzeciego roku życia, zwykle jest to wiek około sześciu lat, a szczyt zachorowań przypada na 10-11 r. ż. Postać kliniczna choroby z wolem jest bardziej powszechna u młodocianych pacjentów^[8,9].

Pierwsze przypadki choroby opisał w 1912 roku japoński chirurg Hakaru Hashimoto od którego nazwiska pochodzi nazwa choroby^[10,11].

PPT jest to destrukcyjne zapalenie tarczycy ujawniające się w czasie pierwszych 12 miesięcy po porodzie. Występuje u 5-9% kobiet po porodzie. Ryzyko wystąpienia PPT zwiększa się 3-krotnie u kobiet z cukrzycą typu 1. Może ona również wystąpić po utracie ciąży w 5-20 tygodniu ciąży^[12,13].

1.1.2. Choroba Gravesa-Basedowa GD

Choroba Gravesa-Basedowa jest chorobą autoimmunologiczną, w której głównym autoantygenem jest receptor TSH - TSHR - białko błony komórkowej tyreocyta. Jego pobudzenie przez przeciwciała przeciw receptorowi tyreotropiny (TRAb) powoduje nadmierną aktywację czynności komórek pęcherzykowych tarczycy, zwiększenie wydzielania hormonów tarczycy tyroksyny i trijodotyroniny, stymuluje wzrost tarczycy, rozwój jej unaczynienia, co w konsekwencji objawia się nadczynnością tarczycy. Ponieważ hormony tarczycy są produkowane w nadmiarze, dochodzi do zahamowania wydzielania TSH przez

przysadkę. W zależności od rodzaju przeciwciał przeciwko receptorowi TSH mogą nasilać się odmienne objawy choroby. W obecności stymulujących przeciwciał przeciwireceptorowych (TSI, *Thyroid-Stimulating Immunoglobulin*), wiążących się z TSH, następuje pobudzenie szlaku cykazy adenylowej/cyklicznegoAMP, prowadzące do wzrostu wydzielania hormonów tarczycy. Przeciwciała innego rodzaju, także skierowane przeciwko receptorowi TSH jak tarczycowa immunoglobulina stymulująca wzrost (TGI, *Thyroid Growth-Stimulating Immunoglobulin*), warunkują proliferację nabłonka pęcherzyków tarczycy, powodując nasilenie efektów TSH-zależnych: nadczynność tarczycy, wole mięsiste, orbitopatię tarczycową. U niektórych chorych dochodzi do powstawania przeciwciał przeciwireceptorowych blokujących, które hamują wiązanie tyreotropiny z komórkami pęcherzykowymi tarczycy (TBII, *TSH-Binding Inhibitor Immunoglobulins*), co powoduje niedoczynność tarczycy i zanik gruczołu^[14]. Trzeci rodzaj przeciwciał TRAb, to niedawno odkryte tzw. przeciwciała neutralne (bez sygnalizacji), wiążą się z receptorem TSH przy pomocy peptydów liniowych w przeciwieństwie do przeciwciał stymulujących i blokujących, wykorzystujących głównie wiązanie poprzez epitopy konformacyjne receptora TSH. Przeciwciała te nie stymulują TSHR i nie blokują działania TSH^[15,16].

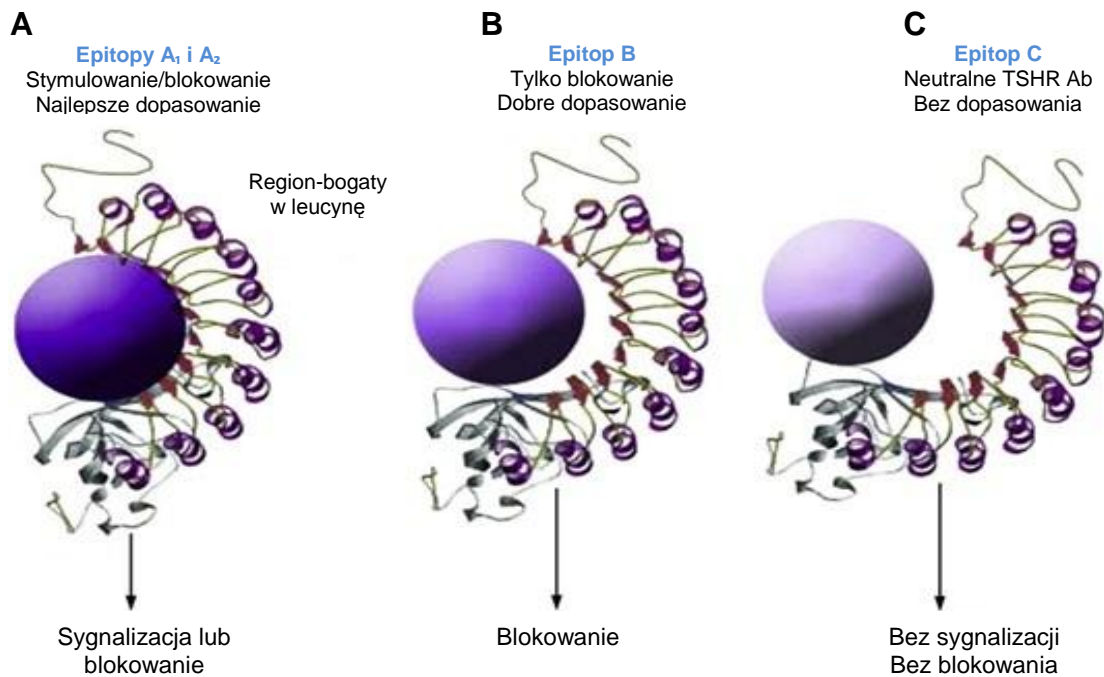
Trzy typy przeciwciał TSHR obecnych w AITD przedstawiono na Rycinie 1.

Objaśnienia

(A) Epitop A1 oznacza miejsce, w którym przeciwciała stymulujące wiążą się z regionem bogatym w leucynę (LRR, *Leucine Rich Repeats*), powodując zmiany strukturalne receptora, które prowadzą do transdukcji sygnału. Epitop A2 reprezentuje podobne - konkurencyjne wiązanie przeciwciał blokujących TSH (również ilustrowane jako najlepsze dopasowanie).

(B) Epitop B oznacza miejsce, gdzie przeciwciała blokujące TSHR wiążą się częściowo do regionu LRR, ale nie mogą doprowadzić do wymaganej zmiany strukturalnej receptora i transdukcji sygnału (przedstawiono jako dobre dopasowanie).

(C) Epitop C oznacza miejsce, gdzie neutralne przeciwciała wiążą się z rozszczepionym i/lub N końcowym regionem ektodomeny TSHR, nie powodując zmian strukturalnych receptora i pozostawiając region LRR wolny dla wiązania TSH i innych przeciwciał TSHR. Dlatego neutralne przeciwciała nie powodują transdukcji sygnału i nie blokują wiązania TSH, zatem są przedstawione jako niepasujące.



Rycina 1. Model wiązania przeciwciał TSHR obecnych w autoimmunologicznej chorobie tarczycy wg Latif R, Morshed SA, Zaidi M, Davies TF. *The thyroid-stimulating hormone receptor: impact of thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor antibodies on multimerization, cleavage, and signaling. Endocrinol Metab Clin North Am. 2009; 38:319^[16]*; zmodyfikowany

W rozwoju GD ważną rolę odgrywa prezentacja swoistych autoantygenów tarczycowych przez molekuly zgodności tkankowej MHC klasy II, takie jak HLA-DR3 lub HLA-DQ, limfocytom pomocniczym T CD4+, które rozpoznają peptydy autogenowe receptora. W tym procesie uczestniczy również cząsteczka antygeny 4 cytotoksycznych limfocytów T (CTLA-4), która w prawidłowych warunkach hamuje aktywację limfocytów T. U dzieci poniżej 4 roku życia choroba występuje z częstością 1:1.000.000/dzieci/rok, u nastolatków poniżej 15 roku życia występuje z częstością 8:1.000.000/dzieci/rok i jest najczęstszą postacią nadczynności tarczycy w wieku rozwojowym. Szczyt zachorowania przypada na wiek 11-15 lat i dotyczy 6-8-krotnie częściej płci żeńskiej^[8].

Dzieci urodzone przez matki, które w czasie ciąży leczone były z powodu nadczynności tarczycy, powinny być obserwowane w kierunku dysfunkcji tarczycy i w razie potrzeby leczone zaraz po urodzeniu^[17,18].

Choroba występuje 10 razy częściej u kobiet, co może sugerować znaczenie estrogenów w jej powstawaniu. Poza podłożem genetycznym wskazuje się także na wpływ stresu na ujawnienie choroby (może wystąpić po silnym urazie psychicznym). Palenie tytoniu zwiększa ryzyko orbitopatii i nadczynności tarczycy w przebiegu choroby. Mogą jej towarzyszyć inne schorzenia autoimmunologiczne jak: niedokrwistość złośliwa, bielactwo, miastenia, celiakia, reumatoidalne zapalenie stawów, niedoczynność kory nadnerczy, czy

toczeń. Nazwa choroby Gravesa-Basedowa pochodzi od irlandzkiego lekarza Roberta Gravesa i niemieckiego lekarza Karla von Basedowa, którzy opisali kilka przypadków choroby w 1835 i 1840 r. [11,19,20,21].

1.2. Epidemiologia autoimmunologicznej choroby tarczycy

Przewlekłe autoimmunologiczne zapalenie tarczycy określane również mianem zapalenia limfocytarnego, czy choroby Hashimoto występuje we wszystkich grupach wiekowych z częstością do 2%, także u dzieci. Znacznie częściej u płci żeńskiej, gdyż dotyczy 0,1%-5% kobiet dorosłych w krajach Europy Zachodniej, manifestując się niedoczynnością tarczycy. Zapadalność oceniana na 0,3-1,5 przypadków na 1000, na rok jest zaniżona. W badaniach autopsyjnych stwierdza się zapalenie tarczycy typu Hashimoto u 14-17 % badanych osób.

Choroba Gravesa-Basedowa występuje u 0,1-0,2% dorosłej populacji krajów Europy Zachodniej, w większości u osób młodszych, gdy w wyniku przewlekłej stymulacji tarczycy poprzez przeciwciała przeciwko receptorowi tyreotropiny rozwija się nadczynność tarczycy. Predyspozycja dziedziczna odgrywa tu istotną rolę, ponieważ u >50% chorych występują w rodzinie inne przypadki AITD. Choroba ma charakter wielogenowy, a stres, palenie tytoniu i inne czynniki środowiskowe zwiększają ryzyko jej wystąpienia^[11].

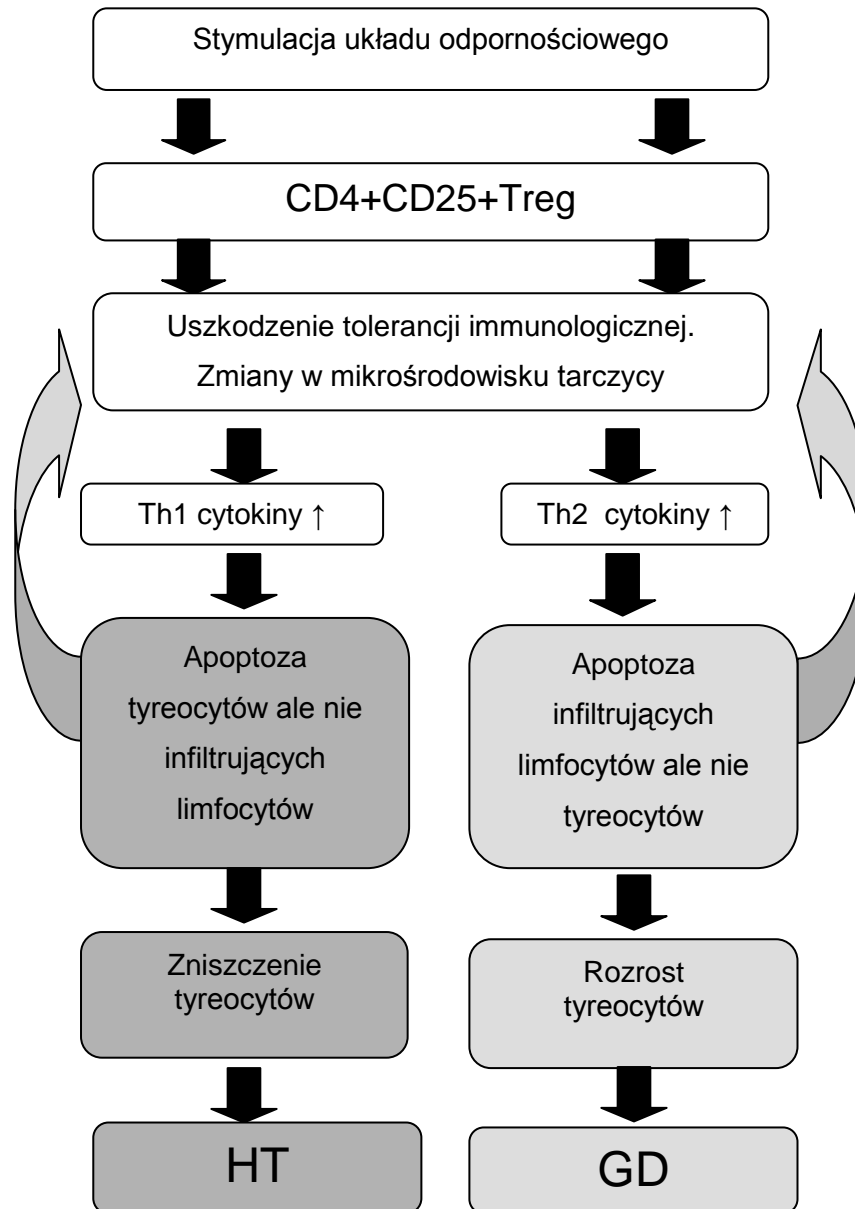
1.3. Etiopatogeneza autoimmunologicznej choroby tarczycy

Autoimmunologiczna choroba tarczycy potwierdzana przez obecność w surowicy przeciwciał skierowanych przeciwko głównym autoantygenom tarczycy: tyreoglobulinie (TG), peroksydazie tarczycowej (TPO) i receptorowi TSH (TSHR) występuje u >10% populacji Stanów Zjednoczonych powyżej 12 roku życia i jest najczęstszą przyczyną zaburzeń endokrynologicznych w populacji o prawidłowej podaży jodu. Przeciwciała ATPO są obecne prawie u wszystkich pacjentów z chorobą Hashimoto, u dwóch trzecich pacjentek z zapaleniem tarczycy po porodzie, a także u 75% pacjentów z nadczynnością tarczycy Gravesa-Basedowa^[22,23].

Wytworzenie przeciwciał dla TPO, TG i TSHR jest decydujące dla rozpoznania autoimmunologicznej choroby tarczycy. Podstawowym patomechanizmem jest brak tolerancji limfocytów T, prowadzący do infiltracji limfocytarnej gruczołu tarczycy przez limfocyty T CD4+ i CD8+. Na obraz choroby składa się obecność cytokin, takich jak: IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF α , IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17 i IL-23, które są produkowane przez naciekające gruczoł tarczycy komórki odpornościowe oraz pośredniczą w cytotoksyczności, w powiązaniu ze złożoną odpowiedzią immunologiczną i

humoralną.^[24,25,26] W przewlekłym autoimmunologicznym limfocytarnym zapaleniu tarczycy typu Hashimoto dominują mechanizmy immunologiczne zależne od limfocytów T, uszkodzenie komórek tarczycy za pośrednictwem uwalnianych cytokin oraz śmierć komórek na drodze apoptozy, co skutkuje niedoczynnością tarczycy i zanikiem gruczołu. Natomiast w chorobie Gravesa-Basedowa dochodzi do stymulacji komórek tarczycy i jej nadczynności, wynikającej z reakcji autoprzeciwciał TRAb. Obie choroby choć klinicznie przeciwstawne łączą wspólne procesy immunologiczne, odpowiedzialne za inicjację procesów autoimmunizacji tarczycy^[27].

Schemat patogenezy AITD przedstawia Rycina 2.



Rycina 2. Patogeneza limfocytarnego zapalenia tarczycy typu Hashimoto (HT) i choroby Gravesa-Basedowa (GD) wg Wang SH, Baker JR: *The role of apoptosis in thyroid autoimmunity. Thyroid 2007; 17(10): 975-979*^[28]; zmodyfikowana

1.3.1. Czynniki genetyczne

Dokładna etiologia AITD nadal pozostaje nieznana, ale interakcja pomiędzy podatnością genetyczną, a wpływem czynników środowiskowych wydaje się mieć podstawowe znaczenie w jej rozwoju. Za progresję choroby odpowiadają w 79% czynniki genetyczne, czyli mutacje i polimorfizmy genów związanych z funkcją układu odpornościowego i w 21% czynniki środowiskowe wraz z podatnością osobniczą.

Polimorfizmy genetyczne związane z AITD przedstawia Tabela 1.

Tabela 1. Polimorfizmy genetyczne związane z chorobami tarczycy wg Weetman AP, *The Immunopathogenesis of Chronic Autoimmune Thyroiditis One Century after Hashimoto Eur Thyroid J 2012;1:243-250*^[29]

Polimorfizmy genów	Możliwy efekt
Geny głównego układu zgodności tkankowej (HLA u ludzi)	Geny te mogą powodować destrukcję na drodze komórkowej (HLA klasy I), lub przez prezentację autoantygenów (HLA klasy II)
Geny komórek odpornościowych T	CTLA-4 i PTPN22 regulują aktywację limfocytów T; IL-2RA koduje receptor interleukiny-2; FCRL3 wpływa na czynność komórek T regulatorowych
Inne geny odpowiedzi immunologicznej	CD40 koduje i stymuluje komórki prezentujące antygen; CD226 koduje własną aktywację receptora na komórkach NK
Geny specyficzne dla tarczycy	Geny kodujące dwa autoantygeny tarczycy: tyreoglobulinę i TSH-receptor, mogą regulować ich dostęp do układu immunologicznego

Zidentyfikowano kilka genów odpowiedzialnych za powstawanie autoimmunologicznej choroby tarczycy. Geny immunomodulujące takie jak: 1. molekuly głównego kompleksu zgodności tkankowej MHC klasy II, 2. geny odpowiadające za odpowiedź immunologiczną jak: antygen-4-cytotoksycznych limfocytów T (CTLA-4), 3. cząsteczka CD40, 4. białko fosfatazy tyrozynowej-22 (PTPN 22) oraz geny specyficzne dla gruczołu tarczowego: 5. TG, 6. TPO i 7. TSHR. Niektóre z nich są wspólne dla obu chorób cAIT i GD, podczas gdy inne są specyficzne dla GD^[30].

Geny te w interakcji z czynnikami środowiskowymi takimi jak zakażenia bakteryjne, stres, palenie tytoniu, zawartość jodu w diecie, prawdopodobnie z powodu wspólnych mechanizmów, prowadzą do ujawnienia się choroby. Mechanizmy i czynniki środowiskowe, które mogą wywołać reakcję autoimmunologiczną tarczycy u osób podatnych genetycznie, są nadal niejasne, ale interakcja między genami a środowiskiem została uznana za zasadniczy proces rozwoju AITD^[30,31].

Rodzinne występowanie AITD zostało udowodnione przez badaczy już wiele lat temu. Badania wykazały, że u 33% rodzeństwa z GD lub cAIT rozwinęła się AITD, a u 56% rodzeństwa z AITD produkowane są autoprzeciwciała przeciwarczycowe. Badania u bliźniąt potwierdziły dziedziczną podatność na AITD. Najsilniejsze epidemiologiczne dowody na genetyczne skłonności do AITD pochodziły z badań bliźniąt, które wykazują znacznie wyższą podatność na AITD wśród bliźniąt jednojajowych (MZ), niż dwujajowych (DZ). W kilku dużych

badaniach wykazano wysoką zgodność występowania AITD u MZ w porównaniu do DZ, która kształtowała się na poziomie 35% u MZ i 3% u DZ w chorobie Gravesa, a 55% u MZ i 0% u DZ dla choroby Hashimoto^[32,33,34,35,36].

1.3.1.1. Geny odpowiedzi immunologicznej

1.3.1.1.1. MHC

Region głównego kompleksu zgodności tkankowej MHC stanowi grupę genów zlokalizowanych w obrębie chromosomu 6p21, które kodują białka związane z odpowiedzią immunologiczną. Region MHC koduje geny, które są pogrupowane w trzy klasy: klasa I obejmuje geny *HLA A, B i C*, klasa II zawiera geny *HLA-DR, DP i DQ*, i klasa III, której geny obejmują składniki komplementu C4, czynnik martwicy guza alfa, białko szoku termicznego 70 i inne białka^[30,36,37].

W chorobie Gravesa-Basedowa wykazano pozytywny związek polimorfizmu genu *HLA-DR3* z wystąpieniem objawów choroby, w przeciwieństwie do *HLA-DR5*^[30,38,39]. Częstotliwość występowania *HLA-DR3* u pacjentów chorych na GD wynosi zazwyczaj 40-55% w porównaniu do 15-30% u osób w ogólnej populacji. Wśród osób rasy kaukaskiej wykazano efekt predysponujący do GD dla HLA klasy II DR3 (*DRB1*03, DQB1*02 i DQA1*05*) i efekt ochronny dla HLA klasy II DR7 (*DRB1*07, DQB1*02, DQA1*02*), ale ostatnie badania sugerują, że głównym allelem decydującym o podatności na GD jest *HLA-DR3* (*HLA-DRB1*03*). Dane dotyczące występowania haplotypów HLA w chorobie Hashimoto są mniej jasne, niż w GD. Istnieją doniesienia o powiązaniu cAIT i HLA klasy II DR4 (*DRB1*04, DQB1*03 i DQA1*03*) u osób rasy kaukaskiej. Choć choroby charakteryzuje szereg wspólnych markerów genetycznych, to wyraźne różnice w regionie HLA klasy II między HT i GD, mogą przyczynić się do immunopatologicznie i klinicznie różnej prezentacji choroby^[40,41,42,43].

1.3.1.1.2. CTLA-4

W rozwoju choroby Hashimoto istotną rolę odgrywają polimorfizmy w obrębie genu *CTLA-4*. Cząsteczka ta jest głównym negatywnym regulatorem aktywacji limfocytów T poprzez współzawodnictwo w wiązaniu białka B7, obecnego na powierzchni komórek prezentujących antygen z cząsteczką kostymulującą CD28. Dlatego mutacje w genie *CTLA-4* mogą powodować nadmierną aktywację limfocytów T i rozwój autoimmunizacji^[44,45].

Związanie cząsteczki CTLA-4 z przeciwciałem monoklonalnym daje zwiększoną proliferację komórek T i produkcję interleukiny-2. Dodatkowo polimorfizmy genu *CTLA-4* na chromosomie 2q33 są związane z wszelkimi formami AITD w wielu populacjach, w tym wśród rasy kaukaskiej i japońskiej^[37,38]. Niedawno przeprowadzona metaanaliza wykazała istotny związek między polimorfizmem alleli A49G i CT60 z GD i HT^[46]. Podobne badania na populacji polskiej przeprowadziła Pastuszek–Lewandowska w 2012 r^[47]. Podczas gdy ten gen odgrywa istotną rolę w chorobach autoimmunologicznych w ogóle może nie mieć znaczenia w rozwoju narządowo-specyficznej autoimmunizacji i nie musi mieć wystarczającej ekspresji fenotypowej w AITD. Tak więc rola genu *CTLA-4* w autoimmunizacji tarczycy nadal jest niejasna^[46].

1.3.1.1.3. CD40

Cząsteczka CD40 jest członkiem rodziny receptora TNF (TNFR). Jej gen znajduje się na chromosomie 20q a cząsteczka ma kluczowe znaczenie zarówno dla wrodzonej jak i adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej. Jest obecna na powierzchni komórek prezentujących antygen (APC), w tym komórek B. Odgrywa zasadniczą rolę w aktywacji i proliferacji limfocytów B, stymulując wydzielanie przeciwciał. Gen *CD40* jest związany z chorobą Gravesa-Basedowa. Nadekspresja cząsteczki CD40 w komórkach pęcherzykowych tarczycy prowadząca do aktywacji limfocytów B, powoduje przewagę odpowiedzi immunologicznej typu Th2, stymulując produkcję następujących cytokin: IL-4, IL-5, IL-6, IL10, IL-13^[32,38,48].

1.3.1.1.4. PTPN 22

Białko fosfatazy tyrozynowej-22 jest kodowane przez gen *PTPN22*, znajdujący się na chromosomie 1p13 i kodujący cytoplazmatyczną fosfatazę tyrozyny (LYP)^[49]. *PTPN22* ulega ekspresji w grasicy, śledzionie i szpiku kostnym oraz we wszystkich podgrupach mononuklearnych komórek krwi obwodowej. Białko to jest związane z występowaniem AITD jak i innych chorób autoimmunologicznych. Wydaje się, że polimorfizm *PTPN22* może być drugim co do znaczenia genetycznym czynnikiem ryzyka po układzie HLA. Podobnie jak *CTLA-4* posiada funkcję hamowania aktywacji limfocytów T. Przymuszczalnie słaba aktywacja odpowiedzi T-komórkowej, może doprowadzić do upośledzenia usuwania przez grasicę autoreaktywnych limfocytów T i w powiązaniu ze zwiększoną ekspresją *PTPN22* może prowadzić do zahamowania produkcji komórek T regulatorowych, które chronią przed autoimmunizacją^[50,51].

W najnowszych badaniach genetycznych wykazano związek polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP *Single Nucleotide Polymorphism*) genu *PTPN22* z występowaniem chorób autoimmunologicznych w odrębnych grupach etnicznych. W populacji koreańskiej polimorfizm genu *PTPN22* był związany z chorobą Hashimoto, a nie chorobą Gravesa-Basedowa. Natomiast u osób rasy kaukaskiej istnieją dowody na związek polimorfizmu w obrębie tego genu z wystąpieniem objawów choroby Gravesa- Basedowa^[29].

1.3.1.2. Antygeny tarczycowe

1.3.1.2.1. TSHR

Gen *TSHR* znajduje się na chromosomie 14q. TSHR wykazuje ekspresję na powierzchni komórek pęcherzykowych tarczycy, wiąże tyreotropinę poprzez aktywację cykazy adenylowej i pośredniczy w szlaku fosfatydyloinozytolu, prowadząc w efekcie do produkcji hormonów tarczycy. Cechą charakterystyczną choroby Gravesa-Basedowa jest obecność stymulujących autooprzeciwciał TSAb, które pobudzają tarczycę, czego efektem jest nadczynność tarczycy. Stąd też gen *TSHR* jest naturalnym kandydatem odpowiedzialnym za rozwój objawów GD. Receptor TSH podobnie jak receptory dla lutropiny (LH), gonadotropiny kosmówkowej (CG) i folitropiny (FSH), należą do receptorów hormonów glikoproteinowych, związanych z białkiem G. Składa się z N-końcowej domeny zewnątrzkomórkowej określającej swoistość rozpoznawanego hormonu oraz siedmiu regionów przezbłonowych sterujących translacją sygnału do białka G^[52,53].

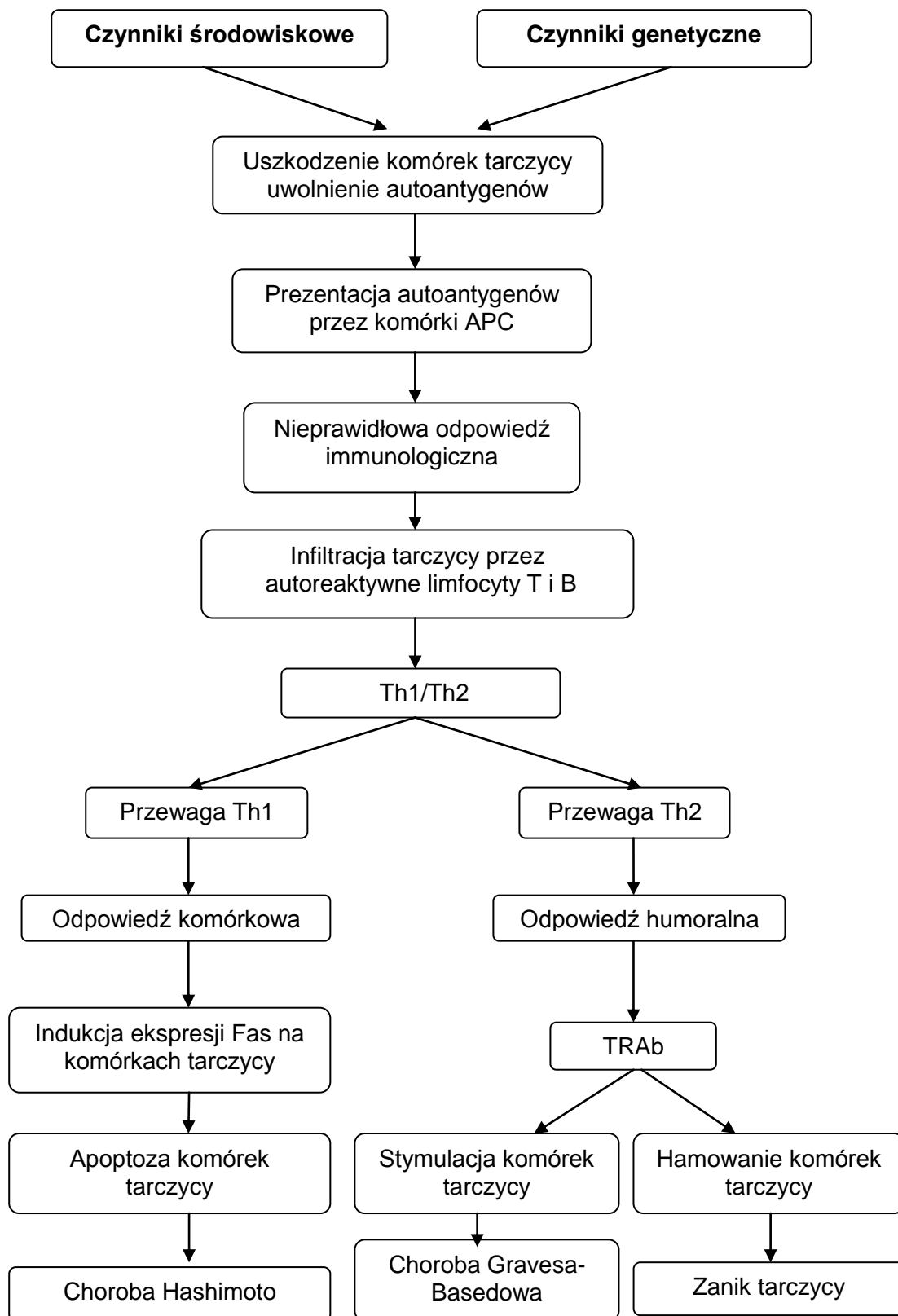
1.3.1.2.2. Tyreoglobulina i peroksydaza tarczycowa

Tyreoglobulina, glikoproteina o ciężarze 660 kDa, składająca się z dwóch identycznych podjednostek o ciężarze 330 kDa każda, jest głównym białkiem syntetyzowanym przez gruczoł tarczycowy, służy jako matryca dla produkcji hormonów tarczycy T3 i T4 oraz odgrywa kluczową rolę w rozwoju autoimmunizacji tarczycy. Jest wydzielana przez komórki pęcherzykowe tarczycy do światła pęcherzyka i przechowywana w formie koloidu. Mała ilość TG jest wydzielana do krwioobiegu, gdzie okres półtrwania wynosi ok. 3 dni. Badania dowiodły, że jodowanie tyreoglobuliny przez TPO jest przyczyną dużej immunoreaktywności TG, wywierając wpływ na powstanie choroby i/lub jej nasilenie. Poziom tyreoglobuliny we krwi może być przydatnym markerem w rozpoznaniu nowotworu w niektórych typach raka tarczycy (szczególnie brodawkowego lub raka pęcherzykowego) oraz może być podwyższony w przypadku choroby Gravesa-Basedowa. Co więcej, wykazano że stężenie TG w surowicy jest zdeterminowane genetycznie i może wpłynąć na

podatność na AITD^[40,54]. Zbadano powiązanie polimorfizmu regionu promotorowego genu *TG*, zlokalizowanego na chromosomie 8q24, z predyspozycją do wystąpienia AITD u pacjentów leczonych IFN- α ^[55]. Immunizacja tyreoglobuliną powoduje autoimmunologiczne zapalenie tarczycy u zwierząt doświadczalnych. Opisano i scharakteryzowano myszy model eksperymentalnego, autoimmunologicznego zapalenia tarczycy EAT (*Experimental Autoimmune Thyroiditis*)^[56]. Przeciwciała ATG są powszechne u pacjentów chorych na AITD. Wysokie miano przeciwciał klas IgG znaleziono u >80% pacjentów z cAIT. Ponadto 94% pacjentów chorych na chorobę Hashimoto z dodatnimi przeciwciałami ATG również posiadało przeciwciała ATPO^[31,38].

Peroksydaza tarczycowa - enzym przez błonowy o masie cząsteczkowej 107 kDa występuje w postaci dimeru w pęcherzykach tarczycy. Antygen TPO znajduje się w szczytowej błonie tyreocyta. Jego główną rolą jest udział w syntezie hormonów tarczycy, przez katalizowanie utleniania jodu, jodowanie reszt tyrozyny i sprzęganie jodotyrozyn (MIT - monojodotyrozyny oraz DIT - diiodotyrozyny) w trijodotyroninę (T3) i tetrajodotyroninę (T4) - tyroksynę. U ludzi TPO jest kodowana przez gen *TPO* składający się z 17 eksonów, zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 2. Przeciwciała ATPO najczęściej związane są z chorobą Hashimoto^[57].

Zarys patogenezy AITD z udziałem czynników genetycznych i środowiskowych przedstawiono na Rycinie 3.



Rycina 3. Mechanizm patogenezy AITD z udziałem czynników genetycznych i nie-genetycznych wg Klecha AJ, Barreiro Arcos ML, Frick L, Genaro AM, Cremaschi G. 2008. *Immune-endocrine interactions in autoimmune thyroid diseases. Neuroimmunomodulation* 15(1):68–75^[3]; zmodyfikowany

1.3.2. Czynniki środowiskowe

Patogeneza AITD ma charakter wielogniskowy i uwzględnia złożone interakcje między czynnikami genetycznymi i środowiskowymi. Przynajmniej 20% udziału przypada czynnikom środowiskowym. Należą do nich: palenie tytoniu, stresujący tryb życia, podaż jodu i selenu, leki (amiodaron, lit, interleukina-2, interferon- α , leki antyretrowirusowe), infekcje bakteryjne i wirusowe, uczulenia, ciąża, radiojod. Mają one duże znaczenie w indukcji i utrzymywaniu reakcji autoimmunologicznych u osób predysponowanych genetycznie. Wspólne mechanizmy, dzięki którym pewne czynniki środowiskowe mogą wywoływać chorobę tarczycy, polegają na zakłóceniu funkcji tarczycy, na bezpośrednim toksycznym działaniu na tyreocyty lub na stymulacji układu odpornościowego^[58].

1.3.2.1. Palenie tytoniu

Palenie tytoniu sprzyja powstawaniu wola prawdopodobnie na skutek działania tiocyjanianów. Wiąże się to ze zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby Gravesa-Basedowa i mniejszym odsetkiem remisji po leczeniu tionamidem. Palenie tytoniu powoduje uwalnianie prozapalnych cytokin (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 i GM-CSF) biorących udział w autoimmunizacji. Wśród pacjentów z GD i współistnieniem TAO przeważają palacze tytoniu. Mechanizm niekorzystnego wpływu palenia tytoniu na chorobę GD a w szczególności TAO uwzględnia aktywację limfocytów T i B, zwiększoną produkcję IL-2, co prawdopodobnie łączy się z hipoksją w przestrzeni oczodołowej, indukowaną przez palenie tytoniu^[59].

1.3.2.2. Stres

Doniesienia naukowe pokazują powiązania między stresem a AITD. Pacjenci z chorobą Gravesa-Basedowa podawali więcej negatywnych i stresujących zdarzeń życiowych w czasie poprzedzającym wystąpienie choroby w porównaniu do osób zdrowych. Hormonalna reakcja na stres poprzez aktywację osi podwzgórze-przysadka-nadnercza, prawdopodobnie powoduje przełączenie odpowiedzi immunologicznej z Th1 na Th2, która tłumia odporność komórkową i poprawia humoralną, wyjaśniając dlaczego niektóre choroby autoimmunizacyjne są często poprzedzone intensywnym stresem^[60].

1.3.2.3. Jod

W pobudzeniu autoreaktywności tarczycy kluczowe znaczenie ma efekt stymulujący jodu na komórki układu immunologicznego takie jak: makrofagi, limfocyty T i B, cząsteczki

adhezyjne i komórki dendrytyczne. Jod jest więc głównym modulatorem procesu autoimmunizacji tarczycy. Stężenie jodu w diecie zalicza się do głównych zewnętrznych czynników środowiskowych, mających wpływ na podatność zachorowania na AITD. Odpowiednie spożycie jodu jest niezbędne do syntezy hormonów tarczycy i warunkuje prawidłową czynność tarczycy, natomiast nadmiar jodu przyspiesza indukcję autoimmunologicznego zapalenia tarczycy u genetycznie podatnych osób^[61].

Badania populacyjne monitorujące niedobór jodu oraz częstość występowania AITD w różnych regionach, wskazują na silny związek między spożyciem jodu i rozwojem chorób autoimmunologicznych tarczycy. Częstość występowania autoimmunologicznego zapalenia tarczycy w Stanach Zjednoczonych wzrosła jednocześnie ze stopniowym wzrostem ilości jodu w diecie. W Grecji prospektywne badania u chorych z wolem endemicznym wykazały zwiększenie częstości występowania przeciwciał przeciw-tarczycowych, po podaniu doustnym lub wstrzykiwaniu jodu^[62]. W regionach gdzie spożycie jodu jest wysokie częstość HT jest większa w stosunku do regionów, gdzie spożycie jodu jest prawidłowe, czy stosunkowo niskie. Wreszcie GD najczęściej występuje na obszarach o wystarczającej ilości jodu, a wszelkie nie-autoimmunologiczne choroby tarczycy częściej występują w obszarach o niskiej zawartości jodu w diecie^[61,63,64].

1.3.2.4. Leki

1.3.2.4.1. Interferon α

Niektóre leki mogą wywołać lub zaostrzyć autoimmunizację tarczycy u osób wrażliwych, podatnych genetycznie. IFN- α , lek stosowany w wirusowym zapaleniu wątroby typu C, wywołuje wytwarzanie autoprzeciwciał, w tym przeciwciał przeciw-tarczycowych u osób genetycznie podatnych. W przebiegu przewlekłego autoimmunologicznego zapalenia tarczycy może rozwinąć się niedoczynność tarczycy. Istnieje też ryzyko wywołania choroby Gravesa-Basedowa^[65]. Proces zapalny w obrębie tarczycy nie jest odwracalny - nawet po wielu latach od zakończenia leczenia IFN- α , stwierdza się przewlekłe zapalenie tarczycy. Interferon alfa u ok. 10-15% pacjentów powoduje niedoczynność, a u 20-40% powoduje wytwarzanie przeciwciał przeciw-tarczycowych. IFN- α wykazuje działanie cytotoksyczne poprzez zwiększoną ekspresję perforyny i komórek NK oraz hamowanie limfocytów pomocniczych Th2 i wzmacnianie odpowiedzi immunologicznej limfocytów pomocniczych Th1^[55,66,67,68].

1.3.2.4.2. Amiodaron

Amiodaron, lek antyarytmiczny, to pochodna benzofuranowa bogata w jod, która w 14-18% przypadków wywołuje zaburzenia czynności tarczycy - hipotyreozę lub tyreotoksykozę. Działanie cytotoksyczne na komórki tarczycy wywiera jego główny metabolit dysetyloamiodaron. Ze względu na dużą zawartość jodu (37% masy cząsteczkowej), wykazuje podobne do jodu działanie na gruczoł tarczowy, wywołując autoimmunologiczne dysfunkcje tarczycy^[69]. W normalnych i autoimmunologicznych modelach szczurzych narażonych na amiodaron opisano zmiany na poziomie komórkowym tj. apoptozę, martwicę i infiltrację makrofagów^[31,70].

1.3.2.4.3. Lit

Lit, który jest często stosowany w leczeniu zaburzeń dwubiegunowych, może być odpowiedzialny za rozwój wola, niedoczynności tarczycy lub tyreotoksykozy. Wzrost stężenia TSH w surowicy krwi indukowany podażą litu może zwiększać ekspresję autoantygenów na powierzchni tyreocytów i w ten sposób zaostrzać przebieg istniejących wcześniej procesów autoimmunologicznych. Ponadto lit wywiera swoiste działanie immunomodulujące^[71].

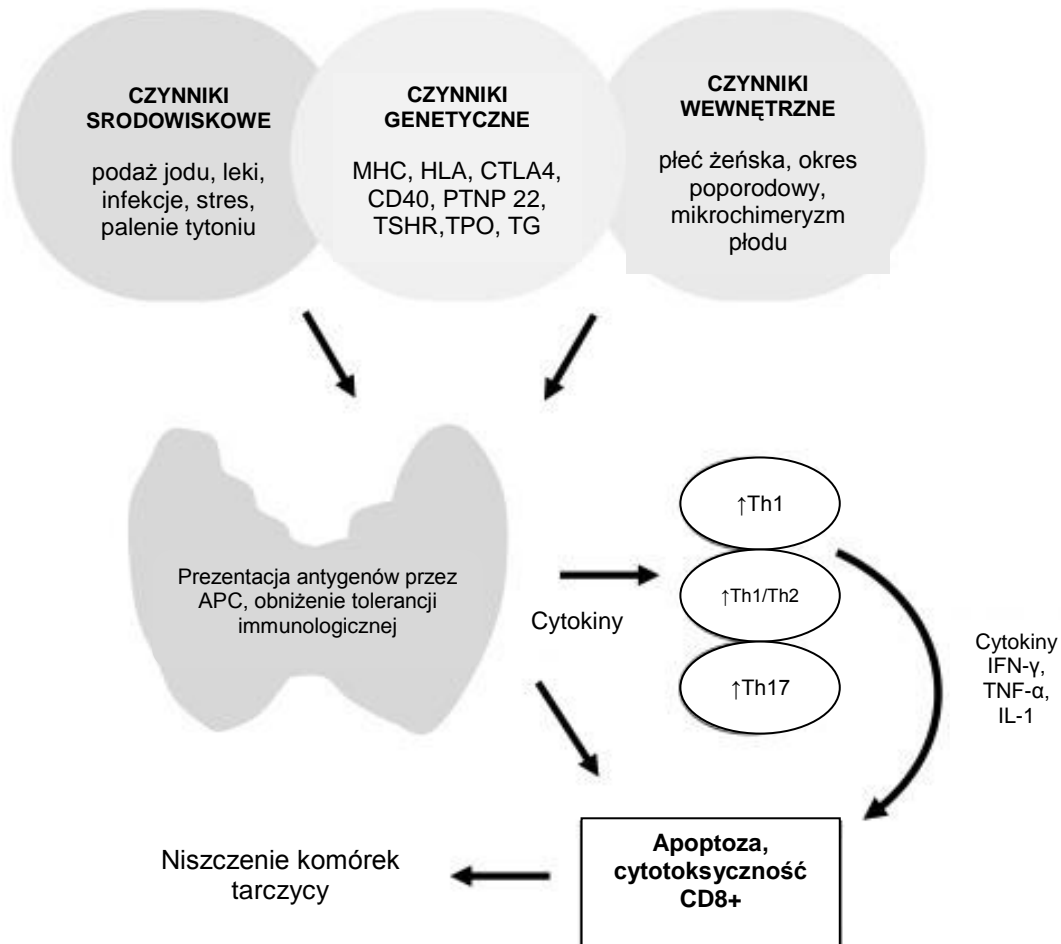
1.3.2.5. Zakażenia

Od dawna wiadomo, że zakażenia odgrywają rolę w patogenezie kilku chorób o podłożu autoimmunologicznym i endokrynologicznym takich jak: toczeń rumieniowaty układowy, *miastenia gravis*, zespół Sjögrena, zespół Reitera, gorączka reumatyczna i cukrzyca typu 1. Zarówno zakażenia bakteryjne jak i wirusowe w tym *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia enterocolitica*, wirusy Coxsackie i retrowirusy stanowią potencjalny czynnik ryzyka rozwoju autoimmunologicznej choroby tarczycy AITD u osób genetycznie predysponowanych. Hipoteza molekularnej mimikry wykorzystuje podobieństwa sekwencji między białkami wirusowymi lub bakteryjnymi i białkiem własnym co może wywołać krzyżową odpowiedź immunologiczną na własne antygeny, z obniżeniem tolerancji, w efekcie skutkując autoimmunizacją. Szczególnie prawdopodobny jest wpływ zakażeń na patogenezę choroby Gravesa-Basedowa^[39].

W ostatnich latach udokumentowano obecność dużej liczby przeciwciał przeciwko białkom bakterii *Yersinia enterocolitica* u krewnych pacjentów z AITD. W surowicy krwi pacjentów z autoimmunologiczną chorobą tarczycy odkryto występowanie z większą częstotliwością przeciwciał przeciwko kilku serotypom *Yersinia enterocolitica*. Wykryto też molekularne podobieństwo antygenów błony komórkowej *Yersinia enterocolitica* do TSH.

Co więcej, miejsca wiązania TSH na powierzchni tej bakterii były rozpoznawane przez autoprzeciwciała przeciwko receptorowi TSH^[72].

Mechanizm autoimmunizacji tarczycy przedstawiono poniżej na Rycinie 4.



Rycina 4. Mechanizm autoimmunizacji tarczycy w HT wg Zaletel K, Gaberscek S: *Hashimoto's Thyroiditis: From Genes to the Disease. Curr Genomics* 2011; 12(8): 576-588^[73]; zmodyfikowany

1.4. Rola układu immunologicznego w patofizjologii AITD

Autoimmunizacyjne zaburzenia funkcji tarczycy tworzą obraz, w którym choroba Gravesa-Basedowa, charakteryzująca się nadczynnością leży na jednym biegunie, a choroba Hashimoto, objawiająca się niedoczynnością tarczycy na drugim. Przeciwciała przeciwko antygenom tarczycy są obecne w obu tych chorobach, ale ich swoiste epitopy są różne, prowadząc do różnic funkcjonalnych przeciwciał. Rozwój AITD następuje w wyniku utraty tolerancji immunologicznej i reaktywności na autoantygeny tarczycy, co doprowadza do infiltracji gruczołu przez limfocyty T oraz limfocyty B, które produkują charakterystyczne przeciwciała, z kliniczną manifestacją nadczynności tarczycy w GD i niedoczynności tarczycy, w przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniu tarczycy cAIT. Ponadto w cAIT limfocyty T indukują apoptozę komórek pęcherzykowych tarczycy, prowadząc do destrukcji gruczołu^[74,75].

Przypuszcza się, że komórki APC należące do głównego układu zgodności tkankowej MHC klasy II, zwłaszcza komórki dendrytyczne, gromadzą się w obrębie gruczołu tarczowego. Komórki APC prezentują antygeny swoiste dla tarczycy limfocytom obecnym w węzłach chłonnych, co prowadzi do aktywacji i proliferacji autoreaktywnych limfocytów T i B. W ten sposób aktywowane swoiste dla antygenów limfocyty pomocnicze T CD4+, indukują powstawanie limfocytów cytotoksycznych T CD8+ oraz aktywują limfocyty B, produkujące autoprzeciwciała, tworząc ektopowe ośrodki namnażania. Naciekanie gruczołu przez cytotoksyczne limfocyty T jest przede wszystkim odpowiedzialne za destrukcję mięszu tarczycy^[13,36,75].

Obecność podgrupy komórek immunologicznie kompetentnych z aktywnością supresyjną, zapobiegającą potencjalnie szkodliwej odpowiedzi autoimmunologicznej zawdzięcza się regulatorowym limfocytom T CD4+CD25+ (Treg). Brak komórek T regulatorowych u ludzi i u myszy skutkuje rozwojem licznych układowych zaburzeń autoimmunizacyjnych takich jak: zapalenie tarczycy, zapalenie stawów, zapalenie błony śluzowej żołądka, stwardnienie rozsiane, zapalenie jajnika i inne^[76,77].

Obecnie udokumentowano istnienie trzech różnych populacji limfocytów T CD4+: Th1, Th2 i Th17. Rozwój i różnicowanie natywnych limfocytów CD4+ w populacje komórek Th jest poprzedzony rozpoznaniem antygeny przy współdziałaniu MHC klasy II i przekazywaniu sygnałów przez komórki dendrytyczne DC, posiadające receptory toll-podobne (TLR) i receptory lektynowe typu C (CLR). Rozwój komórek Th1 zależy od IL-12, komórek Th2 od IL-4, komórek Th17 od TGF- β i IL-6^[78].

Komórki Th1 produkują cytokiny prozapalne IL-2, IFN- γ , TNF α , IL-1 β , co prowadzi do aktywacji makrofagów i efektów cytotoksyczności. Natomiast Th2 wydzielają IL-4, IL-5, IL-6,

IL-10, IL-13, które mogą hamować produkcję cytokin Th1, ale głównie stymulują limfocyty B do produkcji przeciwciał i aktywację cząsteczek antyapoptotycznych^[79].

Charakterystykę odpowiedzi immunologicznej w AITD przedstawia Tabela 2.

Tabela 2. Fenotypowa charakterystyka choroby Hashimoto i Gravesa-Basedowa wg Fountoulakis S, Tsatsoulis A: *On the pathogenesis of autoimmune thyroid disease: a unifying hypothesis. Clin Endocrinol (Oxf) 2004; 60(4): 397-409*^[80]

Parametr	Choroba Hashimoto	Choroba Gravesa-Basedowa
Cząsteczki kostymulujące	B7-1	B7-2
Subpopulacja CD+	Przewaga Th1	Przewaga Th2
Profil cytokin	IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-1	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10
Komórki tarczycy	\uparrow Fas, \downarrow Bcl-2, \downarrow sFas, \uparrow TRAIL-R	\downarrow Fas, \uparrow FasL, \uparrow Bcl-2, \uparrow sFas, \uparrow TRAIL
Limfocytarne nacieki	+++	+
Apoptoza komórek	+++	+

W chorobie Hashimoto przeważa odpowiedź immunologiczna limfocytów Th1, sprzyjająca rozwojowi odporności komórkowej oraz śmierci komórek pęcherzykowych tarczycy na drodze apoptozy^[28,81]. Proapoptotyczne ligandy i receptory śmierci takie jak: TNF, FasL i TRAIL obecne na komórkach tarczycy, w warunkach fizjologicznych pozostają nieaktywne^[28]. Jednak ekspresja Fas/FasL indukowana w odpowiedzi Th1 przez infiltrację prozapalnych cytokin IFN- γ , TNF- α i IL-1 β aktywuje apoptozę komórek tarczycy^[82,83].

W GD przewaga komórek Th2 sprzyja odpowiedzi humoralnej, ze zwiększoną produkcją przeciwciał przez limfocyty B. Wzrost stężenia immunoglobuliny G (IgG) oraz cytokin produkowanych przez limfocyty Th2, które promują odpowiedź humoralną, hamuje ekspresję Fas/FasL oraz skutkuje aktywacją cząsteczek antyapoptotycznych Bcl-2, które chronią tyreocyty przed apoptozą, zwiększają natomiast apoptozę limfocytów cytotoksycznych naciekających tkankę tarczycy^[26,81,82].

Nowy podtyp odpowiedzi Th17 może również brać udział w patogenezie GD^[84]. Limfocyty Th17, które zostały opisane stosunkowo niedawno, wydzielają cytokiny prozapalne (IL-17, IL-17F, IL-21, IL-22) i odgrywają ważną rolę w przewlekłych chorobach zapalnych, takich jak astma i toczeń rumieniowaty układowy^[85]. Odsetek limfocytów Th17 u pacjentów z GD po raz pierwszy opisano w pracy Nanba i wsp., wykazując wyższy wskaźnik limfocytów Th17 wśród chorych nieleczonych lekami przeciwtarczycowymi w porównaniu do pacjentów z remisją w GD^[86].

Badanie profilu limfocytów Th17 w przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniu tarczycy typu Hashimoto ujawniło większą ekspresję genu *RORC2* odpowiedzialnego za różnicowanie fenotypu subpopulacji Th17 jak i większą liczbę samych limfocytów Th17 we krwi obwodowej i tkance tarczycy chorych na HT, bez potwierdzenia podobnej sytuacji u pacjentów chorych na GD^[87]. Podobne obserwacje poczynili Idźkowska i Bossowski, wśród dzieci z nowo rozpoznaną HT, otrzymując istotnie statystycznie podwyższone stężenie IL-17 i IL-23, co przemawia za udziałem populacji Th17 w patogenezie HT^[88].

Zewnątrzkomórkowy mechanizm tolerancji obwodowej odbywa się przy udziale limfocytów regulatorowych T CD4+CD25+, głównie regulatorowych typu 1 (Tr1). Limfocyty T regulatorowe zostały po raz pierwszy opisane w latach 70-tych i 80-tych, kiedy nazwano je „supresorowymi” limfocytami. Badania prowadzone na przestrzeni ostatnich kilku lat dowiodły kluczowego znaczenia subpopulacji limfocytów T CD4+CD25+ w odpowiedzi immunologicznej, w której mechanizm supresorowego działania opiera się na bezpośrednim wpływie na komórki pęcherzyków tarczycy. Zakłada się obecnie, że wszystkie limfocyty T regulatorowe cechują się ekspresją czynnika transkrypcyjnego FoxP3, który stanowi niezbędny element w ich rozwoju i funkcjonowaniu^[89,90].

Komórki T regulatorowe odgrywają istotną rolę w zaburzeniach tolerancji immunologicznej na antygeny własne. Niedobór i upośledzenie funkcji tych komórek może stać się przyczyną powstawania chorób autoimmunizacyjnych tarczycy. Nakano i wsp.^[91] odkryli, że odsetek komórek T regulatorowych wśród wewnątrztruczycowych limfocytów był niższy u osób z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy.

U ludzi i u myszy limfocyty T CD4+CD25+ stanowią około 5-10% populacji limfocytów T CD4+. Pośredniczą w mechanizmach supresji, poprzez hamowanie wydzielania IL-2 i wydzielanie cytokin przeciwzapalnych, takich jak IL-4, IL-10, i TGF- β . Tak więc działanie limfocytów T regulatorowych moduluje i hamuje reakcję immunologiczną odpowiedzi Th1, Th2 i Th17^[90,92,93].

Dlatego kliniczna manifestacja autoimmunizacji tarczycy w kierunku obrazu fenotypowego GD lub cAIT w dużej mierze zależy od balansu odpowiedzi immunologicznej Th1 lub Th2 wywołanej przez APC, oraz od profilu cytokin, który dominuje w tym momencie w miąższu tarczycy. Fakt, że oba stany mogą rozwijać się u tej samej osoby w różnych punktach czasowych sugeruje, że równowaga Th1-Th2 i związany z tym profil cytokin jest dynamicznym procesem, rozwijającym się pod wpływem czynników zewnętrznych, działających w lokalnym środowisku gruczołu tarczowego^[94,95].

1.5. Udział przeciwciał w patogenezie AITD

Autoimmunologiczna choroba tarczycy jest chorobą z autoagresji, która dotyczy ok. 5% populacji i jest najczęstszą chorobą autoimmunizacyjną narządowo specyficzną. Aktywowane limfocyty B wydzielają wiele przeciwciał skierowanych przeciwko głównym antygenom tarczycowym. Występowanie przeciwciał przeciwtarczycowych jest charakterystyczną cechą choroby^[96].

1.5.1. Przeciwciała ATPO i ATG

Przeciwciała przeciwko peroksydazie tarczycowej są markerem autoimmunologicznym chorób tarczycy. ATPO są obecne u prawie wszystkich pacjentów z chorobą Hashimoto, u dwóch trzecich pacjentów z zapaleniem tarczycy po porodzie, a także w 75% pacjentów z nadczynnością tarczycy w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa. Peroksydaza tarczycowa jest głównym enzymem biorącym udział w hormonogenezie tarczycy. Antygen ten został zidentyfikowany w 1959 roku jako antygen mikrosomalny tarczycy. Poziom przeciwciał ATPO związany jest z ekspresją MHC na tyreocytach i stopniem infiltracji limfocytów, które mogą ulec „uczuleniu” i wyzwolić syntezę autoprzeciwciał^[97,98]. Przeciwciała są produkowane głównie przez limfocyty infiltrujące gruczoł tarczowy i tylko w niewielkim stopniu przez miejscowe węzły chłonne lub szpik kostny. Okazuje się, że obecność gammaglobulin przeciwtarczycowych stwierdzana jest u 12–26% osób nie wykazujących objawów choroby tarczycy i stanowi czynnik ryzyka ujawnienia się niedoczynności tarczycy w przyszłości. W przeciwieństwie do przeciwciał przeciwtyreoglobulinowych, przeciwciała ATPO są zdolne do indukowania układu dopełniacza oraz komórkowej cytotoksyczności. Zachodzi też duża korelacja pomiędzy stężeniem przeciwciał przeciwperoksydazowych, a obecnością nacieków limfocytarnych gruczołu tarczowego^[73,99].

Przeciwciała ATPO mają charakter poliklonalny, heterogenny i skierowane są ku różnym częściom cząsteczki TPO, a większość z nich rozpoznaje epitopy umiejscowione na powierzchni enzymu TPO. Znaczenie mają dwa główne immunomodulujące konformacyjnie regiony A i B (IDR-A i IDR-B) na powierzchni TPO, które znajdują się w bliskim sąsiedztwie, a nawet zachodzą na siebie. Badania wykazały, że przeciwciała przeciwko domenie IDR-B dominują u większości pacjentów z chorobą HT i GD^[100,101].

ATPO są obecne również u pacjentów chorych na cukrzycę typu 1 i w innych chorobach autoimmunizacyjnych: w chorobie Addisona, w reumatoidalnym zapaleniu stawów, w zespole Sjögrena, SLE, twardzinie, fibromialgii^[98,102].

W badaniu populacyjnym NHANES III częstość występowania przeciwciał ATPO w USA u zdrowych osób rasy białej wynosiła 12,3%, podobnie wśród ludności pochodzenia meksykańskiego 10,1% i znacznie mniej wśród Amerykanów rasy czarnej 4,5%. Płeć żeńska związana jest z 2-4 krotnie wyższą częstością występowania ATPO. Natomiast odsetek przeciwciał wzrasta z wiekiem niezależnie od płci do prawie 30% u przewlekle chorujących osiemdziesięciolatków. Przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie występują u 97% pacjentów z chorobą Hashimoto i w ok. 50% przypadków choroby Gravesa-Basedowa oraz przemijająco u 10–20% pacjentów z podoстрыm zapaleniem tarczycy (chorobą de Quervaine'a)^[73,103].

W wieloośrodkowym badaniu przeprowadzonym w latach 2007-2010 w Polsce (PolSenior), wśród populacji w wieku od 65 do 90 lat, podwyższone stężenie ATPO stwierdzono u 19%. Częstość występowania dodatnich ATPO była wyższa u kobiet niż u mężczyzn (26,6% vs. 15,5%). Spośród 1.542 osób o znanych stężeniach ATPO i TSH w stanie eutyreozы było 72%, u 20,6% stwierdzono niedoczynność tarczycy a nadczynność tarczycy miało 7,4% badanej grupy^[104].

1.5.2. Przeciwciała TRAb

TRAb - przeciwciała przeciwko receptorowi tyreotropiny naśladują funkcję TSH i wywołują chorobę, poprzez wiązanie się z receptorem TSH oraz stymulowanie lub hamowanie komórek tarczycy do produkcji hormonów T3 i T4. Pacjenci z chorobami autoimmunizacyjnymi tarczycy mogą mieć w surowicy zarówno stymulujące, blokujące jak i neutralne przeciwciała^[15]. Obraz kliniczny choroby jest wynikiem względnej siły każdego rodzaju przeciwciał. Podczas gdy choroba Gravesa-Basedowa charakteryzuje się wytwarzaniem autoprzeciwciał stymulujących TSHR-TSAb, inna grupa chorych z autoimmunologiczną chorobą tarczycy może posiadać autoprzeciwciała blokujące aktywację TSHR-TBAb.^[105,106]

Oznaczanie stężenia TRAb jest pomocne w rozpoznaniu różnicowym nadczynności tarczycy, choroby Gravesa-Basedowa o autoimmunologicznej etiologii oraz w przewidywaniu nawrotów choroby po leczeniu lekami przeciwtarczycowymi. Pacjenci z wysokim poziomem TRAb (>10 IU/l) cechują się 8,7 do 31,1 razy większym ryzykiem ciężkiego przebiegu GO oraz mają wysokie prawdopodobieństwo nawrotu choroby Gravesa-Basedowa po wstępnym leczeniu lekami przeciwtarczycowymi^[106,107]. Obecnie do wykrywania przeciwciał TRAb stosuje się szeroko w Europie i w Japonii testy kompetycyjne drugiej generacji TBII, opracowane po raz pierwszy przez B. Rees Smith'a i współpracowników^[108]. Test ten jednak nie różnicuje biologicznej aktywności przeciwciał TSAb i TBAb, co jest możliwe przy zastosowaniu testów biologicznych, na bazie hodowli komórkowej i ludzkiego rekombinowanego TSHR, oparte na pomiarze cAMP, jednak ze względu na pracochłonność

i koszty, takie testy nie są stosowane powszechnie. Testy TBII drugiej generacji mają 100% swoistość oraz 96% czułość diagnostyczną^[109,110,111]. W testach trzeciej generacji zastosowano monoklonaalne przeciwciała stymulujące (M22) wyprodukowane z limfocytów pacjentów chorych na GD. Przeciwciała obecne w surowicy pacjenta hamują wiązanie monoklonaalnych przeciwciał stymulujących (MAb) z receptorem TSH. Testy te posiadają nieznacznie wyższą czułość diagnostyczną 98%^[109].

1.6. Zjawisko apoptozy

Apoptoza nazywana „programowaną śmiercią komórki” jest mechanizm śmierci komórkowej, który odgrywa ważną rolę w procesie homeostazy ustroju, przez zapewnienie wzajemnej równowagi między namnażaniem i śmiercią komórek oraz bierze udział w regulacji immunologicznej procesów życiowych komórki. Uszkodzenie mechanizmów apoptozy może prowadzić do ogólnoustrojowej autoimmunizacji, umożliwiając przetrwanie autoreaktywnych limfocytów T^[112,113].

Regulacja procesu apoptozy następuje na poziomie receptorów śmierci i ekspresji ich ligandów, białek adaptorowych, kaskady kaspaz, czynników mitochondrialnych oraz anty- i proapoptotycznych białek. Istnieją dwie drogi apoptozy. Droga I zwana „drogą zewnętrzną” jest inicjowana przez aktywację receptorów śmierci na błonie komórkowej tyreocytów i następuje przez aktywację kaspazy 8, w dalszej kolejności prowadząc do destrukcji tyreocytów. Droga II zwana „drogą wewnętrzną” obejmuje zmiany integralności struktury w obrębie mitochondrium, jest inicjowana przez różne efekторы, co prowadzi do uwolnienia cytochromu c i aktywacji kaspazy 9. W dalszej części kaskady przemian obie drogi zewnętrznej i wewnętrznej, łączą się we wspólnym punkcie, jakim jest kaspaza 3^[114].

Przekazywanie sygnałów indukujących apoptozę odbywa się za pośrednictwem trzech różnych receptorów błonowych i odpowiadających im ligandów śmierci. Aktywacja tego szlaku rozpoczyna się od pobudzenia receptorów śmierci, należących do nadrodziny receptorów TNF: TNF-R1, Fas, TRAIL-R1 i TRAIL-R2. Połączenie receptora z ligandem śmierci skutkuje zmianą konformacji receptora. Interakcja receptor błonowy Fas/ligand Fas zapoczątkowuje apoptozę przez oligomeryzację (łączenie najczęściej po trzy domeny) zakotwiczonych w cytoplazmie związanych z Fas domen śmierci DD (*Death Domain*), które łączą się z cząsteczką pośredniczącą FADD (*Fas Associated Death Domain*), inicjując kaskadę proteolityczną kaspaz, 8 i 10. Powstały kompleks DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) kontynuuje proteolizę kolejnych prokaspaz: 9-3-7. Formowanie kompleksu DISC podlega kontroli białek c-FLIP (*FLICE Inhibitory Proteins*), których rolą jest hamowanie apoptozy. c-FLIP łącząc się kompetycyjnie z DISC inaktywuje prokaspazę 8, uniemożliwiając dalszą kaskadę proteolizy kolejno przyłączanych enzymów^[115,116].

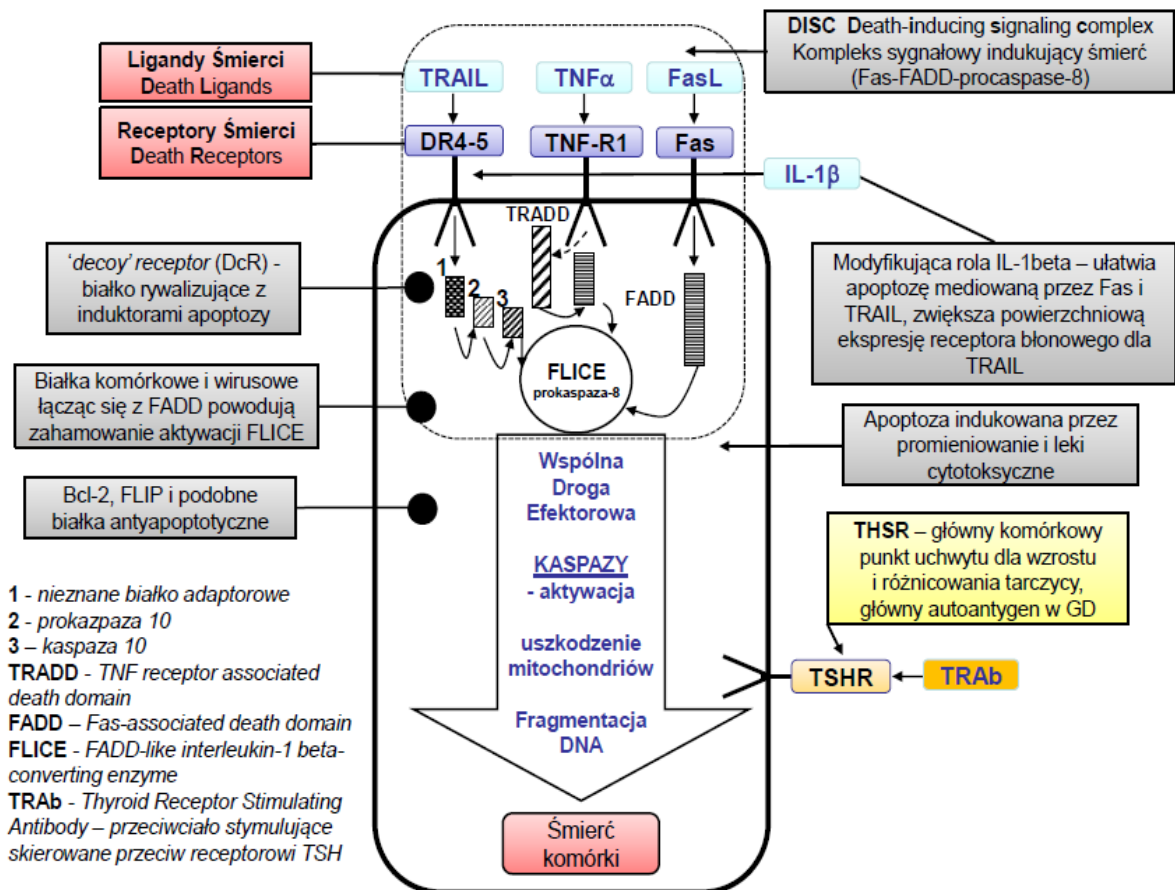
TRAIL - (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) indukuje apoptozę przez oddziaływanie z dwoma receptorami błonowymi DR4 (lub TRAIL-R1) i DR5 (lub TRAIL-R2). Występuje zarówno w postaci związanej z błoną komórkową tyreocytów jak i w postaci rozpuszczalnej. TRAIL ulega ekspresji w wielu prawidłowych tkankach płodowych, co sugeruje jego ochronne działanie przeciwko cytotoxyczności komórek. Jest to poparte obserwacjami, iż TRAIL może wzbudzać apoptozę w komórkach nowotworowych, ale nie w komórkach prawidłowych^[117,118].

Układ TNF- α /TNF-R1 jest bardziej rozbudowany i przekazuje sygnały zarówno pro jak i antyapoptotyczne. Po połączeniu z ligandem także zmienia się konformacja regionu cytoplazmatycznego i zakotwiczone w cytoplazmie białko TRADD (*TNFR-Associated Death Domain*), podobnie jak FADD aktywuje molekuly sygnałowe: czynnik związany z TNF (TRAF-2), białko pośredniczące (RIP), białka homologiczne do innych domen śmierci (RAIDD), skupiając je w kompleks receptorowy aktywujący dalej kaskadę kaspaz, 8, 10 i 2. Połączenie RIP i TRAF-2 aktywuje również kinazę c-Jun (*c-Jun NH2-Terminal Kinase*), inicjującą transkrypcję genów odpowiedzialnych za apoptozę.

Do aktywacji wewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych dochodzi również na drodze zaburzenia integralności błony komórkowej mitochondriów, z udziałem rodziny białek regulatorowych Bcl-2. Do rodziny tej należą białka proapoptotyczne Bax, Bad, Bak oraz antyapoptotyczne Bcl-2, Bcl-X, zlokalizowane w obrębie błony mitochondrialnej. Białka te między sobą łączą się w homodimery np. Bcl-2/Bcl-2 lub heterodimery Bcl-2/Bax.

Przeżywalność komórki pęcherzykowej tarczycy zależy od relacji inhibitorów lub promotorów apoptozy. Przewaga białek proapoptotycznych na zewnętrznej błonie mitochondrialnej powoduje indukcję apoptozy, przez uwalnianie cytochromu c z wnętrza przestrzeni mitochondrialnej. Uwolniony do cytozolu cytochrom c łączy się z czynnikiem aktywującym apoptozę APAF-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*) wraz z prokaspazą 9 tworząc apoptosom, co prowadzi do aktywacji kaskady kaspaz, powodując apoptozę komórki. Przewaga natomiast białek antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2 zapobiega uwalnianiu cytochromu c do cytozolu, chroniąc komórkę przed śmiercią. Prawidłowe tyreocyty wykazują wysoką ekspresję antyapoptotycznego białka Bcl-2, natomiast w tyreocytach pochodzących z gruczołu, w którym toczy się proces zapalny w przebiegu przewlekłego autoimmunologicznego zapalenia tarczycy, stwierdza się obniżoną ekspresję tego białka^[28,74,112,119].

Regulację procesu apoptozy w tyreocycie przedstawiono na Rycinie 5.



Rycina 5. Regulacja apoptozy w tyreocyte wg Arcscott PL, Baker JR, Jr.: *Apoptosis and thyroiditis. Clin Immunol Immunopathol* 1998; 87(3): 207-217^[120]; modyfikacje: W. Stacha, M. Niedziela, M. Mikoś (2007)

1.7. Rola apoptozy w patogenezie cAIT i GD

Liczne dowody sugerują, że nieprawidłowa ekspresja Fas/FasL i zaburzenia apoptozy z udziałem Fas mają znaczenie w etiologii chorób o podłożu autoimmunizacyjnym. Apoptoza uczestniczy w patogenezie specyficznych narządowo chorób autoimmunologicznych, takich jak choroba Hashimoto i choroba Gravesa-Basedowa.

FasL jest białkiem błonowym typu II należącym do rodziny czynnika martwicy guza TNF o masie cząsteczkowej 40 kDa i uczestniczy w cytotoksyczności komórkowej. Wcześniej wykrywany był w aktywowanych limfocytach T. FasL występuje także w jądrach, przedniej komorze oka, łożysku i mózgu, i innych narządach immunologicznie uprzywilejowanych, z uwagi na eliminację naciekających je limfocytów T^[121].

Receptor dla FasL - Fas (Apo1/CD95) jest receptorem przezbłonowym typu I, należącym do rodziny receptorów TNF, które aktywują i sygnalizują apoptozę we wszystkich

rodzajach komórek. Na powierzchni tyreocytów pochodzących od pacjentów z chorobą Hashimoto, stwierdzono nadmierną ekspresję Fas i FasL^[122,123].

Czynnikiem, który odpowiada za indukcję ekspresji Fas w prawidłowych tyreocytach jest IFN- γ w połączeniu z IL-1 β lub TNF- α . Wzajemne interakcje Fas/FasL na powierzchni sąsiadujących tyreocytów mogą wzbudzać „bratobójczą” apoptozę stanowiąc istotny mechanizm niszczenia tyreocytów w HT^[124,125].

Histologicznie HT charakteryzuje się dużymi naciekami limfocytarnymi w obrębie lub dookoła komórek pęcherzykowych tarczycy, co przemawia za destrukcją tych komórek przy udziale układu immunologicznego. W gruczole tarczowym, w którym toczy się proces zapalny w przebiegu HT, obserwuje się wysoki poziom apoptozy, który dotyczy ok. 30% tyreocytów. Najwięcej apoptotycznych komórek pęcherzykowych występuje w miejscu nacieku limfocytarnego, a liczba ich jest uzależniona od nasilenia procesu zapalnego i fazy zapalenia^[80].

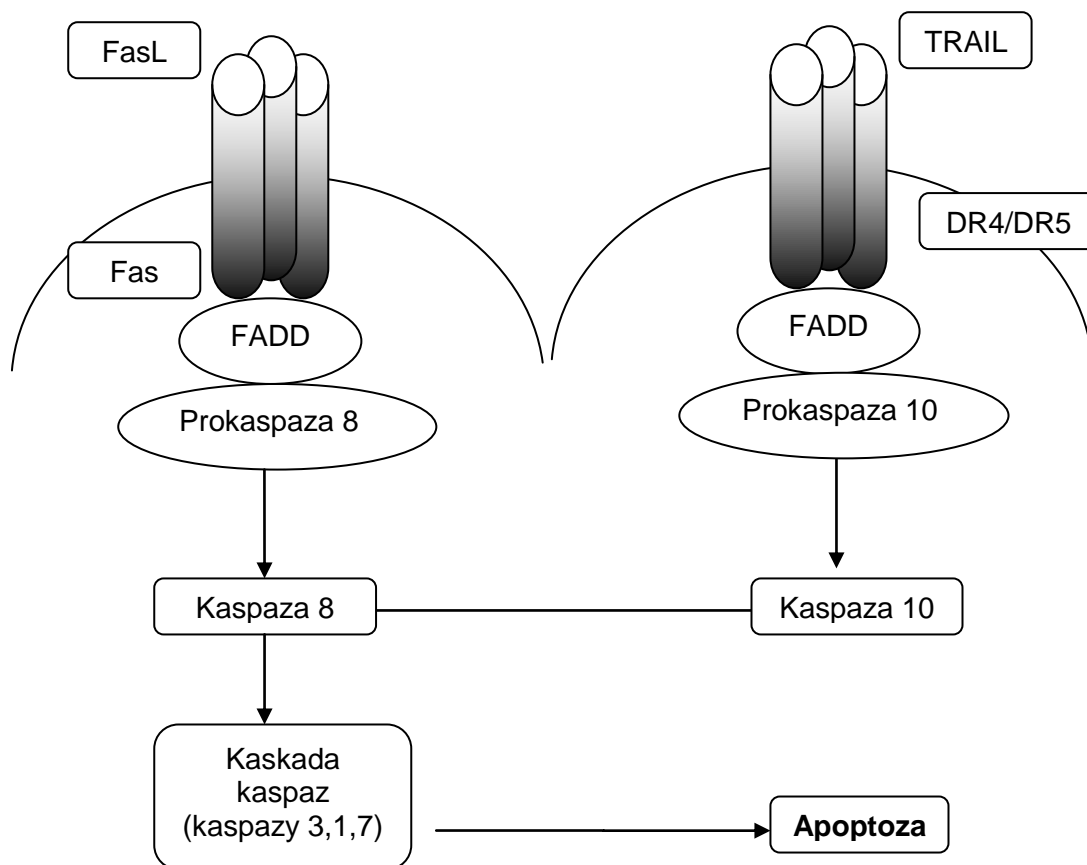
Mechanizm apoptozy w chorobie Hashimoto z charakterystycznym niszczeniem komórek tarczycy może być konsekwencją niewłaściwej ekspresji Fas/FasL lub cząsteczek śmierci TRAIL oraz obniżenia ekspresji białka Bcl-2, które jest wywołane przez cytokiny uwalniane lokalnie w mięszu tarczycy. Zniszczenie komórek tarczycy w autoimmunologicznej chorobie tarczycy zależy od T komórkowej cytotoxyczości w połączeniu z mechanizmami śmierci na drodze apoptozy, skutkując masywną apoptozą tyreocytów. Natomiast apoptoza naciekających limfocytów w GD w połączeniu ze zwiększoną ekspresją białek antyapoptotycznych z rodziny Bcl-2 na powierzchni komórek tarczycy, w wyniku ich oporności na apoptozę prowadzi do rozrostu gruczołu. W rzeczywistości limfocyty występujące w GD okazują się być bardziej podatne na apoptozę, w porównaniu z wewnątrztrzęczykowymi limfocytami obecnymi w HT^[28].

Różnice w mechanizmach apoptozy prowadzą do powstania dwóch różnych rodzajów reakcji autoimmunologicznych w obrębie tkanki tarczycowej. Porównanie tkanki tarczycowej u pacjentów z GD i HT wykazało znaczące różnice w ekspresji Fas, FasL, Bcl-2 i nasilenia apoptozy^[81].

Komórki limfocytów T, cechujące się ekspresją FasL, szczególnie podgrupa CD8+ mogą wzbudzać apoptozę w tyreocytach wykazujących ekspresję Fas w przebiegu autoimmunologicznego zapalenia tarczycy typu Hashimoto. W chorobie Gravesa-Basedowa histologicznie nacieki limfocytarne mięszu tarczycy są mniej rozległe, a liczba apoptotycznych tyreocytów jest znikoma, co świadczy o zwiększonym mechanizmie przetrwania komórek tyreocytów i aktywnym procesie zabijania naciekających limfocytów. Proces apoptozy w przebiegu choroby HT i GD jest więc regulowany przez ekspresję cytokin proapoptotycznych Fas i FasL oraz antyapoptotycznych cząstek Bcl-2, chroniących tyreocyty przed apoptozą^[126,127].

W prawidłowej tarczycy, tempo apoptozy jest bardzo niskie, podobnie niski procent apoptozy został wykryty w badaniach immunohistochemicznych tkanki tarczycowej^[128]. W warunkach normalnych podstawowe tyreocyty są odporne zarówno na apoptozę zależną od TRAIL jak i FasL, pomimo ekspresji ich receptorów śmierci na powierzchni błony komórkowej pęcherzyków tarczycy^[129]. Komórki tarczycy muszą być pobudzone przez prozapalne cytokiny: TNF- α , IL-1 β lub interferonem IFN- γ aby uległy apoptozie w odpowiedzi immunologicznej z udziałem ligandów śmierci TRAIL lub FasL^[116,130].

Ligandy i receptory śmierci FasL i TRAIL przedstawia rycina Rycina 6.



Rycina 6. Ligandy i receptory śmierci FasL i TRAIL wg Fountoulakis S, Tsatsoulis A: *On the pathogenesis of autoimmune thyroid disease: a unifying hypothesis. Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60(4): 397-409^[80]; zmodyfikowane

1.8. Udział cytokin w patomechanizmie autoimmunologicznej choroby tarczycy

Cytokiny są glikoproteinami uwalnianymi przez aktywowane komórki różnych tkanek. Stanowią one sieć systemu regulacji wielu procesów jak np.: proliferacja, różnicowanie, sekrecja ważnych biologicznie substancji. Odgrywają kluczową rolę w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej, wpływają na równowagę pomiędzy utrzymaniem własnej tolerancji i inicjowaniem autoimmunizacji. Ponadto mają właściwości hormonopodobne, biorą udział w procesach krwiotworzenia, wpływają na funkcje innych komórek, są mediatorami procesów zapalnych i odpowiedzi immunologicznej oraz procesów naprawy i gojenia się tkanek.

Cytokiny biorące udział w patomechanizmie chorób tarczycy, działają zarówno na układ immunologiczny jak i bezpośrednio na docelowe komórki pęcherzykowe tarczycy. Uczestniczą w indukcji oraz w fazie efektorowej odpowiedzi immunologicznej i zapalnej, odgrywając kluczową rolę w patomechanizmie autoimmunologicznej choroby tarczycy, w tym

choroby Hashimoto oraz choroby Gravesa-Basedowa. W obrębie komórek zapalnych jak i komórek pęcherzykowych tarczycy wykazano obecność wielu cytokin: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, TNF- α i IFN- γ ^[131].

Sieć cytokin obejmuje cytokiny pełniące zróżnicowane funkcje, włączając efekty zarówno promowane przez jedne cytokiny, jak i hamowane przez inne cytokiny. Profil wydzielanych cytokin może być uznany jako prozapalny lub przeciwzapalny, proapoptotyczny lub antyapoptotyczny. Pod wpływem przewlekłej stymulacji antygenem makrofagi i limfocyty T CD4+ dzielą się na komórki odpornościowe Th1 produkujące cytokiny biorące udział w odpowiedzi komórkowej (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β) lub subpopulacje limfocytów Th2, wydzielające cytokiny związane z odpowiedzią humoralną (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) i Th17 produkujące cytokiny prozapalne (IL-17, IL-21, IL-22). Komórki odpornościowe Th3 produkujące głównie TGF β , opisane stosunkowo niedawno, odgrywają istotną rolę w zakresie ochrony przed wystąpieniem chorób autoimmunizacyjnych^[132,133]. Pomimo próby klasyfikacji autoimmunologicznych chorób tarczycy jako klasyczne choroby Th1- lub Th2-zależne, widoczne są mieszane reakcje immunologiczne Th1/Th2, zarówno w HT jak i w GD^[51,86].

Cytokiny są produkowane zarówno przez limfocyty jak i komórki pęcherzykowe tarczycy. Doświadczenia przeprowadzane in vitro potwierdziły produkcję cytokin przez komórki pęcherzykowe tarczycy na skutek stymulacji IL-1 β , IFN- γ i TNF- α , co sugeruje wzrost aktywności prozapalnej oraz zwiększenie infiltracji in vivo. Wymienione cytokiny zwiększają ekspresję cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek pęcherzykowych tarczycy, mogą również stymulować produkcję tlenku azotu (NO) i prostaglandyn (PG), zwiększając reakcję zapalną w AITD. Cytokiny w tkance tarczycowej również odgrywają rolę w prezentacji antygenów limfocytom T, poprzez zwiększenie ekspresji antygenów MHC klasy I i II na powierzchni komórek pęcherzykowych tarczycy, prowadząc do destrukcji gruczołu tarczowego za pomocą T komórkowej cytotoxyczości. W chorobach tarczycy związanych z występowaniem oftalmopatii, patogenne działanie cytokin: IL-1 β , TNF- α i IFN- γ powoduje nasilenie procesu zapalnego i proliferację fibroblastów, skutkujące nagromadzeniem glikozaminoglikanów w obrębie oczodołu. W chorobie Gravesa-Basedowa IL-1 β pobudza produkcję kwasu hialuronowego w komórkach nabłonka tarczycy oraz fibroblastach, przyczyniając się do rozwoju wola^[134,135,136].

Na podstawie badań immunohistochemicznych tkanki tarczycowej stwierdzono obecność IFN- γ w limfocytach naciekających gruczoł tarczycy, IL-1 w komórkach śródbłonka tyreocyta oraz podwyższoną ilość IL-1, IL-6 i TNF- α w komórkach pęcherzykowych tarczycy. W hodowlach komórkowych IL-1 i IL-6 zwiększają proliferację komórek pęcherzykowych tarczycy, ale wykazują również działanie hamujące na tyreocyty, podczas stymulacji tych komórek przez TSH^[137].

Cytokiny w wielu przypadkach wykazują działanie plejotropowe i mogą pełnić funkcje zarówno immunostymulujące jak i immunosupresyjne, zależnie od rodzaju i miejsca docelowego działania. Dla przykładu cytokiny IL-2, IFN- γ i TNF- α mogą wykazywać działanie zarówno pobudzające jak i hamujące choroby autoimmunizacyjne^[65,138].

IFN- γ i TNF- α hamują wzrost i proliferacją komórek pęcherzykowych tarczycy, jednak nie wpływają na żywotność tych komórek^[137]. Prozapalne cytokiny jak IL-1 β , IL-6 i TNF- α , generalnie związane z pobudzeniem stanu zapalnego i autoimmunizacją, mogą również stymulować sygnał w kierunku produkcji limfocytów Treg o hamującym wpływie na rozwój chorób autoimmunizacyjnych^[139].

Cytokiny zwiększają reakcję zapalną poprzez stymulację zarówno limfocytów T i B, co powoduje wytwarzanie przeciwciał i uszkodzenie tkanki tarczycowej na drodze apoptozy, szczególnie w HT^[140].

W AITD cytokiny mogą modulować wzrost i funkcję samych komórek pęcherzykowych tarczycy, odgrywając istotną rolę w pozatarczycowych powikłaniach AITD, szczególnie związanych z oftalmopatią tarczycową. Egzogenne podawanie cytokin np. IFN- α jest związane z pojawieniem się zaburzeń autoimmunologicznych czynności tarczycy oraz powstaniem przeciwciał przeciw tarczycowym ATPO i ATG^[66,131]. Krupińska i wsp. w grupie pacjentów leczonych interferonem α , (bez objawów autoimmunologicznych na początku leczenia), odnotowali podwyższone stężenie przeciwciał przeciw tarczycowym u 17,14% chorych, po dwunastu miesiącach leczenia interferonem^[141].

1.8.1. Charakterystyka badanych cytokin

1.8.1.1 IL-6

Interleukina 6 jest prozapalną cytokiną o plejotropowym działaniu i szerokim spektrum aktywności biologicznej, syntetyzowaną przez różne komórki organizmu. Jej najważniejsze funkcje to udział we wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej, w regulacji ostrych i przewlekłych procesów zapalnych oraz krwiotworzeniu. Dawniej znana była pod nazwami: czynnik stymulujący limfocyty B2 (BSF-2- *B Cell-Stimulatory Factor-2*), interferon β 2, białko 26 kDa, czynnik stymulujący hepatocyty^[142,143].

Ludzki gen *IL-6* zlokalizowany jest na chromosomie 7p15-p21 i charakteryzuje się podobną budową do genu czynnika stymulującego kolonie granulocytów G-CSF^[144].

Syntetyzowana jest przez komórki limfoidalne - limfocyty T i B, monocyty, fibroblasty, synowioocyty, komórki śródbłonna, keratynocyty, komórki mezangium, komórki zrębu szpiku kostnego, komórki uczestniczące w przebudowie tkanki łącznej (osteoblasty i chondrocyty)

oraz niektóre komórki nowotworowe. Produkcja IL-6 stymulowana jest także przez prozapalne cytokiny IL-1 β i TNF- α ^[145].

IL-6 jest cytokiną pełniącą funkcję immunoregulatora, wykazuje działanie czynnika wzrostu, bierze udział w procesie różnicowania komórek, odgrywa znaczącą rolę w indukowaniu odpowiedzi ostrej fazy oraz jest regulatorem funkcji osteoklastów. Ponadto IL-6 aktywuje oś podwzgórze–przysadka–nadnercza, indukuje syntezę ACTH i wpływa na wydzielanie hormonów przedniego płata przysadki takich jak: prolaktyna, hormon wzrostu i lutropina^[146].

Receptor IL-6 składa się z 2 podjednostek: glikoproteiny o masie 80 kDa (IL-6R, CD126, gp80) oraz glikoproteiny o masie 130 kDa (gp130). IL-6 łącząc się ze swoistym receptorem błonowym na powierzchni komórki docelowej wykazuje aktywność biologiczną – działa jako silny stymulator procesów zapalnych, zwrotnie hamuje natomiast wytwarzanie TNF- α i IL-1 β . W płynach ustrojowych IL-6R i gp130 występują w postaci rozpuszczalnej: sIL-6R i sgp130. sIL-6R w połączeniu z IL-6 działa agonistycznie i nie traci zdolności do łączenia się z receptorami na komórkach docelowych, a także wzmacnia działanie IL-6^[147].

Interleukina 6 jest główną cytokiną odpowiedzi ostrej fazy. Syntetyzowana w odpowiedzi na czynnik zapalny stymuluje hepatocyty do produkcji białka C-reaktywnego, surowiczego amyloidu A (SAA), α 1-antytrypsyny, haptoglobiny i fibrynogenu, równocześnie zaś wpływa na zmniejszenie syntezy albumin i transferyny. Powoduje nadpłytkowość przez wpływ na megakariocyty i leukocytozę przez pobudzenie komórek prekursorowych hematopoezy^[148,149]. Interleukina 6 ma również działanie pirogenne i powoduje kacheksję u zwierząt doświadczalnych. Jest więc odpowiedzialna za liczne przejawy odpowiedzi ostrej fazy, gorączkę oraz wyniszczenie w trakcie procesów zapalnych^[143].

W organizmie ludzi zdrowych indukowana w trakcie ostrego zapalenia IL-6 pełni istotną funkcję regulacyjną, wpływając na rekrutację różnych komórek zapalnych (neutrofile, monocyty, limfocyty), stymulację czynników przeciwzapalnych (np. IL-1Ra) oraz ich usuwanie w procesie apoptozy. W ostrym zapaleniu rola IL-6 polega na ograniczaniu reakcji zapalnej, w przewlekłym zapaleniu ma zaś głównie działanie prozapalne. W przebiegu infekcji lub podczas powstania odczynu zapalnego następuje wzrost produkcji i wydzielania dużych ilości IL-6. Zwiększone stężenia IL-6 wykryto w różnych przewlekłych chorobach zapalnych takich jak RZS, młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty układowy, zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa, łuszczyca i choroba Crohna^[148].

Interleukina 6 ma działanie zarówno prozapalne, jak i przeciwzapalne. Działanie przeciwzapalne wynika z jej zdolności do hamowania odpowiedzi zapalnej przez zmniejszanie syntezy TNF- α , IL-1 β i wpływ na ekspresję chemokin. Czynniki martwicy nowotworów TNF- α a i IL-1 β są natomiast czynnikami, które powodują istotne zwiększenie ekspresji IL-6, a także innych cytokin z jej rodziny^[150].

Rola IL-6 w reakcjach odpornościowych wynika zarówno z jej wpływu na różnicowanie limfocytów B i syntezę przeciwciał, jak i pobudzaniu wzrostu oraz różnicowaniu limfocytów T do komórek cytotoksycznych. Dzieje się to poprzez wzrost ekspresji receptora dla IL-2 oraz produkcji IL-2. Interleukina 6 wraz z TGF- β jest także czynnikiem różnicowania limfocytów T pomocniczych do komórek Th17^[151].

Interleukina 6 stymuluje dojrzewanie osteoklastów, wpływając na resorpcję kości, przez co jest jednym z głównych czynników patogenetycznych osteoporozy. Podwyższone stężenie IL-6 obserwuje się także w nadczynności tarczycy w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa co wiąże się ze wzmożonym obrotem kostnym w GD. Na przestrzeni ostatnich lat w piśmiennictwie dużo uwagi poświęca się roli IL-6 w patogenezie i rozwoju nowotworów. Dowiedziono, że IL-6 ułatwia wzrost guza poprzez hamowanie procesu apoptozy komórek nowotworowych oraz indukcję angiogenezy wokół guza. Wykazano udział IL-6 w indukcji wzrostu nowotworu na drodze auto- i parakrynej. IL-6 i jej receptor sIL-6R znajduje zastosowanie jako czynnik rokowniczy choroby nowotworowej. Zwiększenie stężenia IL-6 i sIL-6R stwierdzono w raku macicy, raku płuca, raku piersi, raku nerki, jajnika, jelita grubego oraz w raku gruczołu krokowego, gdzie stężenie wzrastało wraz z rozwojem karcynogenezy^[152,153,154,155,156,157,158].

W chorobie Hashimoto i chorobie Gravesa-Basedowa stwierdza się podwyższone stężenia IL-6, która jest produkowana przez komórki pęcherzykowe tarczycy^[159].

1.8.1.2. IL-1 β

Interleukina 1 obejmuje rodzinę cytokin, do której należy ponad 10 cząsteczek, m.in. IL-1 α , IL-1 β , IL-1 γ (IL-18), IL-1 ϵ , IL-1 δ , IL-1Ra, IL-1H, jednak opisywane działanie biologiczne tych cytokin związane jest głównie z efektami biologicznymi wywoływanymi przez IL-1 β . Interleukina 1 jest jednym z głównych regulatorów reakcji zapalnej i immunologicznej, wydzielanym przez monocyty i makrofagi różnych tkanek. Jest wydzielana przez keratynocyty, chondrocyty, komórki glejowe, komórki mezangium, komórki śródbłonna, limfocyty B i limfocyty T oraz komórki NK (*Natural Killers*). Czynnikiem indukującym powstawanie IL-1 jest LPS (lipopolisacharyd lub endotoksyna) ściany bakteryjnej, a także mogą to być wirusy, bakterie, drożdże, TNF- α oraz inne interleukiny IL-2, IL-3, IL-12^[160].

IL-1 α i IL-1 β kodowane przez 2 oddzielne geny są homologiczne w 25%, powstają w komórce z prekursorów w wyniku działania odpowiednich enzymów proteolitycznych. W przekształceniu prekursora IL-1 β w jej aktywną formę bierze udział proteaza cysteinowa ICE (*Interleukin 1 β -Converting Enzyme*). IL-1 α jest aktywna już jako prekursor i występuje wewnątrz oraz na powierzchni komórek ją wytwarzających. IL-1 α może działać jako cząsteczka błonowa na sąsiednie komórki. IL-1 β to postać głównie sekrecyjna, prawie

zawsze uwalniana przez monocyty krwi obwodowej. Interleukina 1 stymuluje limfocyty T do syntezy innych cytokin prozapalnych, wpływa na proliferację i różnicowanie limfocytów B. Ponadto pobudza uwalnianie czynników wzrostu i czynników chemotaktycznych, tym samym indukuje migrację komórek żernych i podtrzymuje miejscowy proces zapalny. Jednocześnie działa ogólnoustrojowo, powodując podwyższenie temperatury ciała, czy zwiększając wytwarzanie białek ostrej fazy^[161]. IL-1Ra jest antagonistą receptora IL-1 i bierze udział w regulacji zwrotnej, czyli jest przeciwzapalną proteiną konkurencyjnie blokującą receptor IL-1R. W przypadku chorób autoimmunizacyjnych tarczycy wszystkie efekty IL-1 są zwalczane poprzez aktywację specyficznych antagonistów receptorów IL-1 na tyreocytach. Ponadto IL-1 wywołuje lub nasila ekspresję wielu immunologicznie aktywnych cząsteczek, takich jak cząsteczki adhezyjne, cytokiny i białka regulatorowe w komórkach nabłonkowych tarczycy. IL-1 może więc odgrywać rolę w stanach fizjologicznych (eutyroza), jak i patofizjologicznych stanach chorobowych, przyczyniających się do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych tarczycy^[134].

Istnieją próby hamowania reakcji zapalnych, m.in. w reumatoidalnym zapaleniu stawów i wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego przez podawanie pacjentom rozpuszczalnego receptora IL-1 β i IL-1Ra. Przypuszcza się, że IL-1Ra hamując IL-1 β stanowi jeden z czynników ograniczających proces zapalny. Zaburzenie równowagi stężeń IL-1/IL-1Ra może doprowadzić do przewlekłego stanu choroby^[162].

1.8.1.3. TNF- α

TNF- α - (*Tumor Necrosis Factor- α*), czynnik martwicy guza alfa, kachektyna, to cytokina o plejotropowym działaniu, biorącą udział w odpowiedzi zapalnej i immunologicznej. Jest jednym z 22 białek należących do nadrodziny TNF, białek regulujących różnicowanie i wzrost komórek. Gen kodujący TNF- α jest zlokalizowany na chromosomie 6 w segmencie 6p23-6q12, w pobliżu *HLA-B* i *HLA-DG* w obrębie *locus* MHC klasy III. W organizmie występuje w dwóch postaciach: jako białko przezbłonowe o masie cząsteczkowej 26 kDa oraz jako forma wolna, rozpuszczalna o masie cząsteczkowej 17 kDa. Forma rozpuszczalna jest odpowiedzialna za większość funkcji biologicznych TNF- α , natomiast forma przezbłonowa jest aktywna w procesie apoptozy, w procesach proliferacji komórek, aktywacji limfocytów B, czy w powstawaniu zapalenia^[163].

TNF- α wytwarzany jest przez makrofagi i monocyty, na skutek aktywacji przez lipopolisacharydy LPS ściany komórkowej bakterii. Również wytwarzany jest przez neutrofile, keratynocyty, fibroblasty i komórki tuczne. Pełni rolę w odpowiedzi immunologicznej na infekcje bakteryjne, wirusowe, pasożytnicze, i niektóre grzyby. Działa jako kluczowy pośrednik w miejscowej reakcji zapalnej. TNF- α jest białkiem ostrej fazy, które inicjuje

kaskadę cytokin, zwiększając przepuszczalność naczyń, odgrywa rolę w rekrutacji makrofagów oraz neutrofilów do miejsca infekcji. W wyniku stymulacji przez inne cytokiny takie jak IFN- γ , IL-1 β dochodzi również do bezpośredniego uwalniania TNF- α .

Znane są dwa podstawowe typy receptorów dla TNF: TNFR1 o masie cząsteczkowej 55 kDa, oraz TNFR2 o masie cząsteczkowej 75 kDa. Oba receptory różnią się pomiędzy sobą stopniem glikozylacji, w związku z czym mogą przekazywać różne sygnały komórkom docelowym. TNFR1 jest charakterystyczny dla większości komórek zawierających jądro i ma podobne powinowactwo zarówno do formy błonowej jak i wydzielniczej TNF- α . Natomiast receptor TNFR2 występuje na fibroblastach, komórkach śródbłonna, limfocytach, makrofagach, tymocytach i jest pobudzany przede wszystkim przez formę błonową TNF- α . Białka receptorów składają się z kilku domen: zewnątrzkomórkowej ECD (*Extra Cellular Domain*), przezbłonowej TMD (*Trans Membrane Domain*) i wewnątrzkomórkowej ICD (*Intra Cellular Domain*). W obrębie C- końca łańcucha ICD zlokalizowana jest domena śmierci DD (*Death Domain*) TNFR1, biorąca udział w procesie apoptozy.

Aktywacja "szlaku śmierci" jest możliwa po przyłączeniu do kompleksu TNFR1-TRADD (*TNFR-Associated Dead Domain*) białka adaptorowego FADD (*Fas-Associated Dead Domain*), prowadząc do aktywacji kaspazy 8, która przez proteolityczną aktywację kaspazy 3 inicjuje kaskadę kaspaz, prowadząc do defragmentacji komórki i w efekcie doprowadzając do śmierci komórki. TNFR2 nie łączy się z domenami śmierci TRADD w związku z czym pełni niewielką rolę w indukcji apoptozy. TNF- α za pośrednictwem receptorów błonowych ma największy wpływ na komórki układu immunologicznego oraz układu odpornościowego. Wraz z innymi cytokinami jak IL-2, IL-6, bezpośrednio stymuluje powstawanie i różnicowanie limfocytów B, limfocytów T, komórek NK. Działając również pośrednio, przez stymulowanie innych mediatorów IFN- γ i IL-1 β , współdziała w indukcji cząsteczek MHC klasy II, poprzez wiązanie i prezentację antygenów limfocytom T. Poprzez receptory obecne prawie na wszystkich komórkach jądrzastych posiada wiele różnych właściwości biologicznych: stymuluje powstawanie fibroblastów i osteoklastów, angiogenezę, wykazuje działanie pirogenne, osteolityczne i prozapalne. TNF- α pobudza ośrodek termoregulacji w podwzgórzu, bezpośrednio jak i przez stymulację syntezy IL-1, powodując wzrost temperatury ciała.

TNF- α wykazuje właściwości przeciwnowotworowe, poprzez bezpośrednie działanie na komórki rakowe, przez indukowanie apoptozy tkanek nowotworowych oraz pobudzanie reakcji immunologicznej przeciw nowotworowi. Natomiast zwiększone stężenie TNF- α sprzyja powstawaniu przerzutów, przez zwiększenie syntezy cząsteczek adhezyjnych (ICAM-1, VCAM-1), które sprzyjają przyleganiu komórek nowotworowych do śródbłonna naczyń. TNF- α uczestniczy w patomechanizmie chorób autoimmunizacyjnych.

Korzystne efekty terapeutyczne inhibitorów TNF- α , zaobserwowano w leczeniu MIZS/RZS gdzie zastosowano monoklonalne przeciwciała neutralizujące TNF- α oraz rozpuszczalne receptory uniemożliwiające wiązanie z receptorami powierzchniowymi komórek. Podejmowano też próby zastosowania leku będącego antagonistą czynnika martwicy guza TNF – o nazwie etanercept w leczeniu orbitopatii tarczycowej. W pilotażowym badaniu przeprowadzonym u 10 pacjentów leczonych etanerceptem odnotowano zmniejszenie wskaźnika oftalmopatii (*Ophthalmopathy Index-OI*) po 6 tygodniach leczenia i nie stwierdzono żadnych objawów niepożądanych^[164].

1.8.1.4. TRAIL

TRAIL - (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*), to ligand związany z TNF indukujący apoptozę, białko błonowe typu II należące do nadrodziny TNF. W przeciwieństwie do innych członków nadrodziny TNF, które oddziałują z jednym lub dwoma specyficznymi receptorami, TRAIL potencjalnie może wchodzić w interakcje z pięcioma różnymi receptorami. Należą do nich dwa receptory śmierci DR4 (TRAIL-R1) i DR5 (TRAIL-R2), receptory DcR1 (TRAIL-R3), DcR2 (TRAIL-R4), DcR3 oraz rozpuszczalny receptor związany z kościotworzeniem - osteoprotegeryna (OPG). Działanie TRAIL odbywa się przez indukcję dwóch różnych sygnałów śmierci: z udziałem kaskady kaspaz oraz indukcji genowej za pośrednictwem NF kappaB.^[165]

Niektóre receptory dla TRAIL np. DcR1, DcR2, DcR3 posiadają zewnątrzkomórkowe domeny przyłączające ligand, ale nie posiadają wewnątrzkomórkowych domen śmierci. Są to tzw. receptory wabikowe (*Decoy Receptors*). Przyłączenie czynnika TRAIL przez te receptory nie powoduje aktywacji szlaku apoptozy. Działanie TRAIL jest więc modyfikowane przez wiązanie z receptorami, które nie mogą indukować apoptozy^[166].

Dowodzono, że OPG wiąże się TRAIL *in vitro*, ale z dużo mniejszym powinowactwem w warunkach fizjologicznej temperatury 37°C, w odniesieniu do naturalnego jej liganda RANKL^[167,168].

Badania *in vitro* wykazały, że TRAIL indukuje apoptozę niektórych, ale nie wszystkich, linii komórek nowotworowych. Spowodowane jest to wiązaniem z receptorami DR4 i DR5, które posiadają podobne wewnątrzkomórkowe domeny śmierci jak receptory TNF i Fas/Apo-1, dzięki czemu są zdolne do aktywacji kaskady kaspaz, indukując apoptozę. Poprzez receptory śmierci TRAIL indukuje apoptozę autoreaktywnych limfocytów T i innych komórek zapalnych, natomiast w normalnych zdrowych komórkach rola TRAIL jest nieznana. Ekspresję receptorów DR4 i DR5 w komórkach tarczycy udowodniono za pośrednictwem próby protekcji RNA-azy, testami Western-blot oraz w badaniach immunohistochemicznych przy użyciu dwóch różnych przeciwciał. Wykazano wzrost ekspresji receptorów TRAIL oraz

ich regulację w zapaleniu tarczycy. Ekspresja TRAIL jest najsilniejsza po stymulacji tyreocytów przez IFN- γ , w połączeniu z TNF- α i IL-1 β . Komórki wykazujące obecność na swej powierzchni TRAIL powodowały apoptozę komórek limfatycznych, natomiast obecność przeciwciał przeciwko TRAIL ją hamowały^[82].

Wykazano również obecność mRNA TRAIL w limfocytach naciekających tarczycę, co prowadziło do uszkodzenia pęcherzyków tarczycy w wyniku bezpośredniego kontaktu. Indukcja TRAIL przez cytokiny prozapalne może prowadzić do niszczenia tyreocytów w wyniku ich samobójczej lub bratobójczej śmierci^[80,118].

Egzogenny TRAIL hamuje rozwój autoimmunologicznego zapalenia tarczycy poprzez zmianę funkcji komórek biorących udział w odpowiedzi immunologicznej. Daje to możliwość zastosowania TRAIL w leczeniu autoimmunologicznych chorób tarczycy^[169].

1.8.1.5. FasL

FasL jest białkiem przez błonowy typu II z rodziny czynnika martwicy guza TNF o ciężarze 40 kDa, które pełni ważną rolę w indukcji apoptozy, poprzez wiązanie z antygenem Fas obecnym na komórkach tyreocyta. Postać błonowa FasL jest przekształcana do postaci rozpuszczalnej sFasL przez metaloproteiny. Rozpuszczalne białko sFasL wywiera cytotoksyczne działanie prowadząc do apoptozy limfocytów obwodowych i tyreocytów. Podwyższony poziom w surowicy występuje w wielu schorzeniach proliferacyjnych, nowotworach, infekcji HIV. Poziom sFasL jest charakterystyczny w zmienionych chorobowo płynach z jam ciała: mózgowo-rdzeniowym, płynie z bronchoskopii BAL. W chorobach o podłożu autoimmunologicznym podwyższony poziom występuje w surowicy i płynie stawowym w MIZS, cukrzycy typu 1, stwardnieniu rozsianym i w HT^[170].

Apoptoza Fas-zależna może również odgrywać rolę w usunięciu obwodowych autoreaktywnych limfocytów T po aktywacji immunologicznej, pełniąc ważną rolę w homeostazie immunologicznej organizmu. FasL występuje na powierzchni komórek narządów uprzywilejowanych immunologicznie: jąder, macicy, oka, łożyska i mózgu, uczestnicząc w eliminacji nacieków limfocytarnych. Sugeruje się, że aktywacja szlaku apoptozy Fas/FasL przez cytokiny prozapalne w HT może odgrywać rolę w niszczeniu komórek pęcherzykowych tarczycy, prowadząc do niedoczynności tarczycy. W autoimmunologicznej chorobie tarczycy ekspozycja komórek pęcherzykowych tarczycy na dwie główne cytokiny prozapalne IL-1, IFN- γ indukuje aktywację receptorów Fas na powierzchni tyreocytów^[115,170].

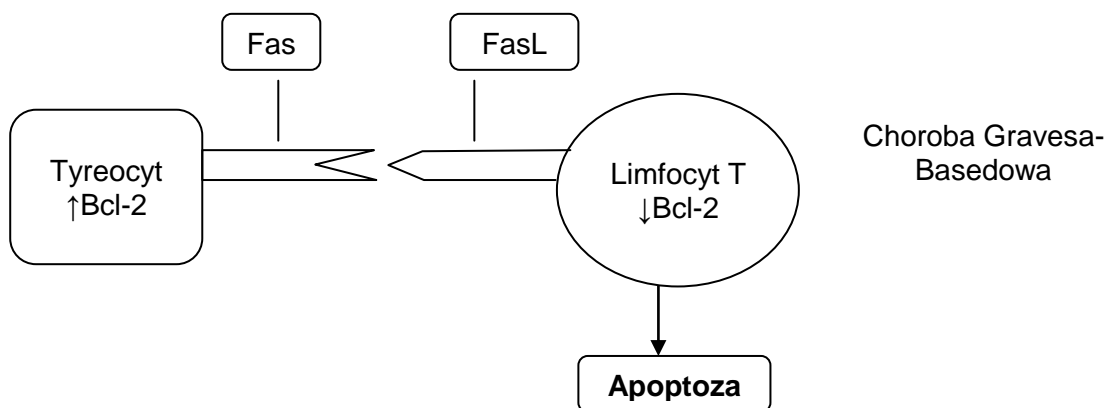
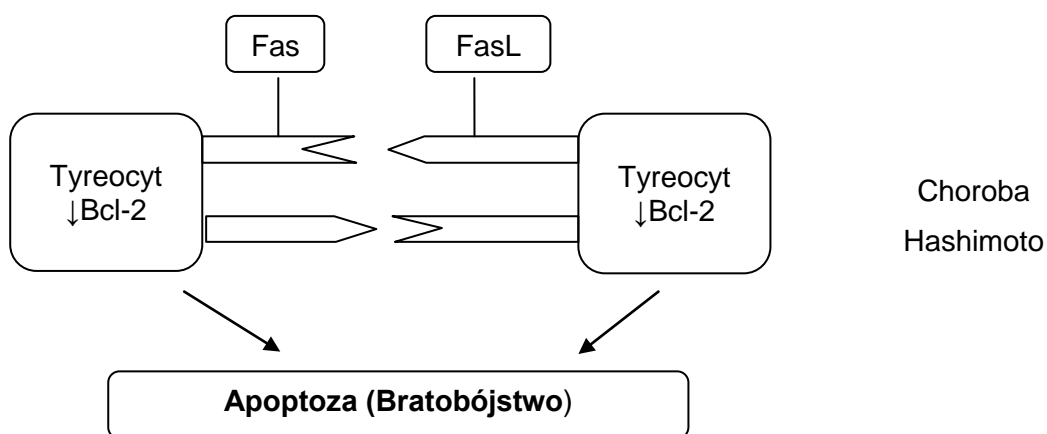
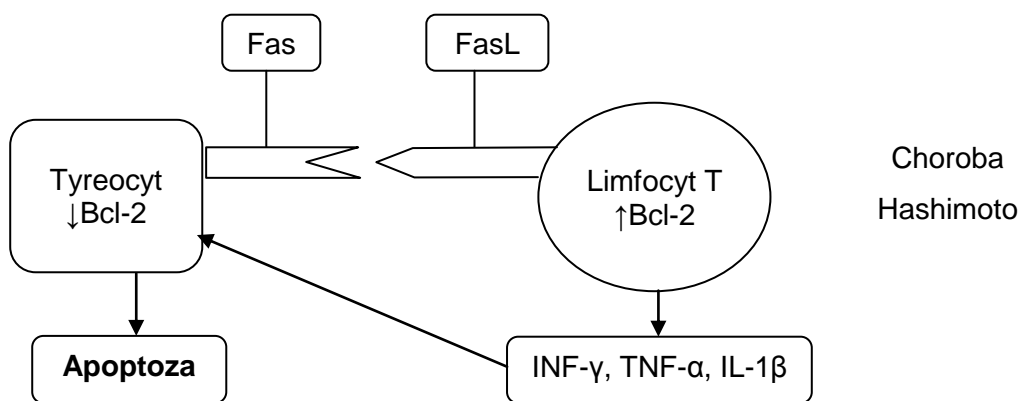
W GD komórki tarczycy są zabezpieczone przed pośrednictwem Fas-zależnej apoptozy, ale ulegają hiperplazji, w wyniku stymulacji przez przeciwciała TSAAb, pobudzające

tarczycę do produkcji nadmiernej ilości hormonów, co prowadzi do nadczynności tarczycy^[119].

Zarówno w HT i GD dochodzi do silnej ekspresji liganda FasL, wraz z receptorem Fas, co tworzy główną drogę do zaprogramowanej śmierci komórek tarczycy^[122].

Stwierdzono, że współczynnik apoptozy tyreocytów koreluje z klinicznymi objawami chorób autoimmunologicznych tarczycy. Identyfikacja cząsteczek CD95, CD95L na powierzchni tyreocyta wykazała, że stopień ich ekspresji istotnie wpływa na zmianę aktywności apoptozy doprowadzając do rozwoju wola lub jego involucji^[171].

Schemat apoptozy Fas/FasL zależnej w autoimmunologicznej chorobie tarczycy przedstawia Rycina 7.



Rycina 7. Model apoptozy Fas/FasL-zależnej w chorobie Hashimoto i Gravesa-Basedowa wg Fountoulakis S, Tsatsoulis A: *On the pathogenesis of autoimmune thyroid disease: a unifying hypothesis. Clin Endocrinol (Oxf) 2004; 60(4): 397-409^[80]*; zmodyfikowany

Stassi i De Maria dowodzą, że w zdrowym miększu tarczycy ekspresja CD95 jest niewystarczająca do zapoczątkowania apoptozy. Natomiast w świeżo wyizolowanych tyreocytach u pacjentów z HT ekspresja CD95, CD95L jest wzmożona w aktywnej fazie choroby, co wskazuje na udział układu receptor-ligand w destrukcji gruczołu tarczycy w HT^[123].

1.8.1.6. Układ cytokin OPG/RANKL

W ostatnim dziesięcioleciu odkryto i opisano zespół białek należących do rodziny cytokin i receptorów TNF, odgrywający kluczową rolę w powstawaniu i aktywacji osteoklastów. Białka te, pozostające ze sobą w ścisłej zależności, to receptor aktywujący czynnik jądrowy kappaB RANK, jego ligand RANKL oraz osteoprotegeryna OPG, działająca jako rozpuszczalny receptor RANKL.

OPG jest glikoproteiną, która powszechnie występuje w organizmie. Jest wytwarzana przede wszystkim przez preosteoblasty, ale mRNA dla OPG znaleziono także w płucach, nerkach, wątrobie, żołądku, jelitach oraz w układzie sercowo-naczyniowym. Natomiast RANKL nie jest tak powszechnym białkiem. Jest on syntetyzowany zarówno przez dojrzałe osteoblasty, ich prekursorzy, jak i przez aktywowane limfocyty T. RANKL działający przez receptor RANK jest czynnikiem aktywującym cały proces tworzenia dojrzałych osteoklastów, a więc ich różnicowanie, fuzję, funkcjonowanie i przeżywanie^[172,173].

Z kolei OPG ma zdolność przyłączania RANKL (stanowi jego rozpuszczalny receptor), co uniemożliwia wiązanie się RANKL z RANK, hamując proces dojrzewania i różnicowania osteoklastów, a w konsekwencji prowadząc do hamowania resorpcji kości^[174].

OPG również wiąże się z TRAIL (ligand indukujący apoptozę związany z TNF), w ten sposób regulując apoptozę komórek tarczycy. System OPG/RANKL/RANK odgrywa kluczową rolę w patomechanizmach schorzeń kostnych i o podłożu autoimmunologicznym^[167].

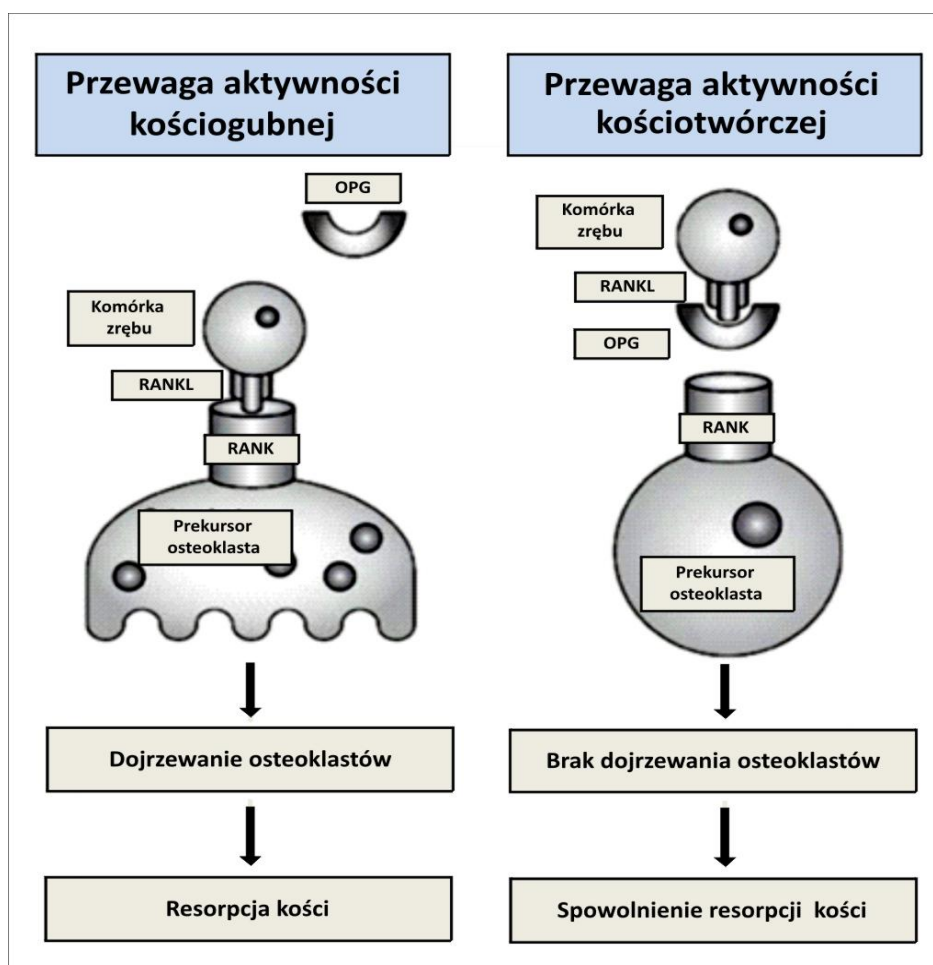
Według piśmiennictwa rola OPG oraz RANKL w fizjologii tkanki tarczycowej nie jest do końca poznana. W prawidłowej tarczycy stwierdzono obecność mRNA dla OPG. Ponadto, poziom mRNA dla OPG w tkance tarczycowej uzyskiwanej podczas operacji pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa był 3-krotnie wyższy w porównaniu z innymi chorobami tarczycy. RANKL i OPG są produkowane w tarczycy przez komórki pęcherzykowe. Indukcja oraz regulacja ekspresji OPG i RANKL w tarczycy kontrolowana jest przez cytokiny prozapalne IL-1 β , TNF α i TSH^[175,176].

Według ostatnich publikacji OPG i RANKL stanowią swoisty pomost pomiędzy tkanką tarczycową i kostną, a zaburzenia funkcji tarczycy mogą zakłócać równowagę OPG/RANKL. W nadczynności tarczycy obserwuje się podwyższone stężenia OPG związane z nadmiarem

hormonów tarczycy i przyspieszonym obrotem kostnym. Leczenie tyreostatyczne prowadzi do normalizacji stężeń OPG oraz markerów obrotu kostnego. Także w niedoczynności tarczycy stwierdza się podwyższone stężenia OPG, które normalizują się po osiągnięciu eutyreozy^[177,178,179].

W nadczynności tarczycy dochodzi zarówno do nasilenia kościotworzenia, jak i resorpcji kości, jednak procesy utraty tkanki kostnej przeważają nad jej produkcją, doprowadzając do redukcji gęstości kości nawet o 12–20%, wtórnej osteoporozy i zwiększenia ryzyka złamań^[180,181].

Udział OPG i RANKL w regulacji gospodarki kostnej przedstawiono na Rycinie 8.



Rycina 8. Rola szlaku OPG/RANKL/RANK w regulacji gospodarki kostnej wg Raggi P, Giachelli C, Bellasi A: *Interaction of vascular and bone disease in patients with normal renal function and patients undergoing dialysis. Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007; 4(1): 26-33^[182]; modyfikacja M. Mikoś (2010)

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

2.1. Założenia pracy:

W patogenezie przewlekłych chorób o podłożu autoimmunologicznym istotną rolę odgrywają czynniki prozapalne, proapoptotyczne i antyapoptotyczne. Czynniki prozapalnymi są: interleukina 1 beta (IL-1 β) i interleukina 6 (IL-6). Czynniki proapoptotyczne to m.in. czynnik martwicy guza alfa (TNF- α), związany z TNF ligand indukujący apoptozę (TRAIL) oraz rozpuszczalna forma liganda dla antygeny błonowego Fas APO-1/CD95 (sFasL). Natomiast czynnikiem antyapoptotycznym jest osteoprotegeryna (OPG), działająca jako rozpuszczalny receptor liganda dla receptora aktywującego jądrocy czynnik wzrostu NF- κ B (RANKL). OPG i RANKL są to cytokiny z rodziny TNF regulujące osteoklastogenezę. OPG również wiąże się z TRAIL, w ten sposób regulując apoptozę komórek tarczycy.

Czynniki te odgrywają istotną rolę w patogenezie autoimmunologicznej choroby tarczycy (AITD). W przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniu tarczycy (cAIT) ma miejsce niszczenie gruczołu tarczowego na drodze reakcji cytotoksycznych, co prowadzi do niedoczynności tarczycy (hipoT), natomiast stymulacja gruczołu przez TRAb w chorobie Gravesa-Basedowa (GD) prowadzi do nadczynności tarczycy (hiperT).

Brak jest natomiast danych literaturowych odnoszących się jednoznacznie co do udziału poszczególnych czynników w rozwoju wymienionych chorób, szczególnie brak badań wyjaśniających ich działanie w patogenezie autoimmunologicznej choroby tarczycy w grupie dzieci i młodzieży.

Celem pracy była:

1. Ocena stężenia wybranych cytokin: IL-1 β , IL-6, TNF- α , TRAIL, sFasL, sRANKL i OPG w surowicy krwi dzieci z autoimmunologiczną chorobą tarczycy:
 - 1) w przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniu tarczycy, prowadzącym do niedoczynności tarczycy (hipoT)
 - 2) w chorobie Gravesa-Basedowa, która w wyniku stymulacji gruczołu prowadzi do nadczynności tarczycy (hiperT).
2. Analiza porównawcza grup badanych dzieci (hipoT i hiperT) z grupą kontrolną (zdrowe dzieci w eutyreozie klinicznej i hormonalnej, bez wola i z ujemnymi przeciwciałami przeciw tarczycowymi)

3. PACJENCI I METODY ZASTOSOWANE W PRACY

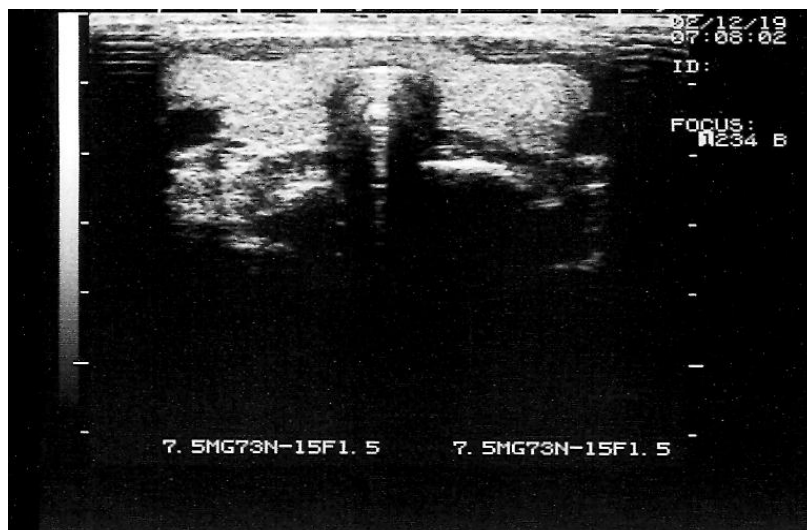
3.1. Pacjenci

Badaniami objęto dzieci z autoimmunologiczną chorobą tarczycy, hospitalizowane w Klinice Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej, Szpitala Klinicznego im. K. Jonschera, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz dzieci objęte opieką Poradni Endokrynologicznej Szpitala Klinicznego im. K. Jonschera Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Pacjenci byli kierowani do oddziału i poradni klinicznych ze względu na podejrzenie autoimmunologicznej choroby tarczycy. Dzieci będące przedmiotem badania nie miały objawów chorób infekcyjnych lub innych dodatkowych zaburzeń, mogących wpływać na wyniki badań (m.in. cukrzyca, celiakia, astma oskrzelowa, choroby nerek, zapalenie stawów, hiperkortyzolemia), tj. występowała izolowana postać choroby. U wszystkich dzieci przeprowadzono badanie pediatryczne podmiotowe, przedmiotowe, dodatkowe badania laboratoryjne oraz USG tarczycy.

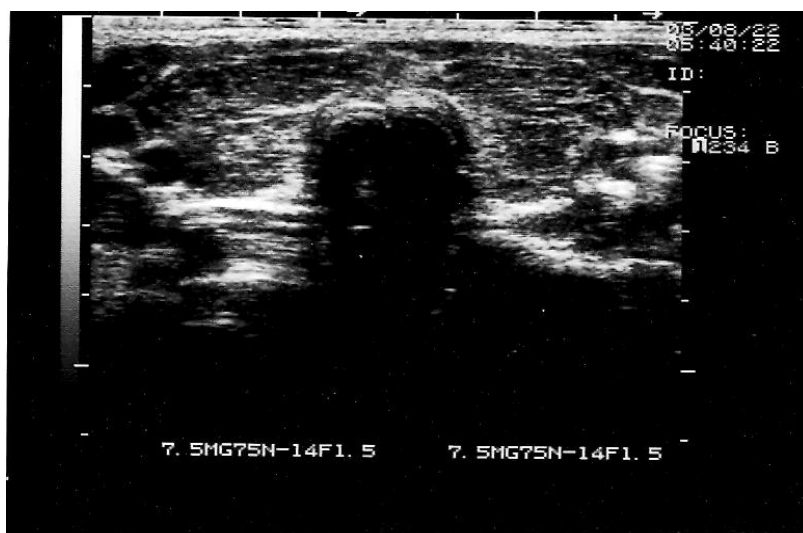
Grupę kontrolną stanowiły dzieci przyjęte do Kliniki na badania diagnostyczne, u których nie stwierdzono cech ostrej choroby infekcyjnej ani żadnej choroby przewlekłej, a uzyskane wyniki potwierdzały prawidłowy stan dziecka.

Do badania włączono pacjentów ze świeżo zdiagnozowaną autoimmunologiczną chorobą tarczycy, zgodnie z kryteriami włączenia do badania.

Autoimmunologiczne zapalenie tarczycy, postać klasyczna zapalenia - choroba Hashimoto potwierdzona przez: 1. wykładniki kliniczne niedoczynności tarczycy, 2. wykładniki hormonalne (podwyższone stężenie hormonu tyreotropowego TSH), 3. wykładniki autoimmunologiczne (dodatnie miano przeciwciał przeciwtarczycowych ATPO i/lub ATG) oraz 4. badanie ultrasonograficzne tarczycy. Obraz ultrasonograficzny gruczołu tarczowego prawidłowy i zmieniony zapalnie, przedstawiono na Rycinach 9 i 10 poniżej.



Rycina 9. Prawidłowy obraz normoechogeniczny, jednorodny gruczołu tarczowego w badaniu ultrasonograficznym - przekrój poprzeczny (ze zbiorów Prof. M. Niedzieli)



Rycina 10. Nieprawidłowy obraz hipoechogeniczny (ATPO>3000 IU/ml) gruczołu tarczowego w badaniu ultrasonograficznym – przekrój poprzeczny (ze zbiorów Prof. M. Niedzieli)

Choroba Gravesa-Basedowa, najczęstsza przyczyna nabytej nadczynności tarczycy u dzieci, w której stymulacja gruczołu prowadzi do jego nadczynności, potwierdzona przez:

1. wykładniki kliniczne nadczynności,
2. wykładniki hormonalne (podwyższone stężenie w surowicy krwi wolnych hormonów tarczycowych ft_4 i /lub ft_3 i obniżone stężenie hormonu tyreotropowego TSH),
3. wykładniki autoimmunologiczne (dodatnie miano przeciwciał przeciw receptorowi TSH - TRAb) oraz
4. wykładniki ultrasonograficzne (hipoechogeniczny gruczoł tarczowy).

Zgodnie z kryteriami włączenia wszyscy pacjenci musieli spełniać następujące warunki:

1. Kryteria hormonalne:
 - dla hipoT podwyższone TSH (>4,67 μ IU/ml)
 - dla hiperT obniżone TSH (<0,49 μ IU/ml), podwyższone fT4(>1,85 ng/ml)
2. Odpowiedni profil autoimmunologiczny przed wprowadzeniem leczenia:
 - dla hipoT dodatnie miano przeciwciał ATPO (>60 IU/ml) i/lub ATG (>60 IU/ml)
 - dla hiperT dodatnie miano TRAb (>1,5 U/l)
3. W badaniu ultrasonograficznym w hipoT i hiperT
 - hipoechogeniczne obszary lub cały gruczoł hipoechogeniczny.

Tylko pacjenci uprzednio nieleczeni L-tyroksyną, bądź tyreostatykami byli poddani badaniu (nowe zachorowanie) oraz w chwili zachorowania pacjenci nie mogli mieć więcej niż 19 lat. Badaniem objęto łącznie 64 dzieci, w tym 45 dziewcząt (70,3%) i 19 chłopców (29,7%) w wieku od 2 do 18 lat.

Badanych pacjentów podzielono na trzy grupy:

- grupa A - 22 dzieci z hipoT, ze świeżo zdiagnozowanym autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy, 18 dziewczynek i 4 chłopców w wieku od 6 lat do 16 lat
- grupa B - 22 dzieci z hiperT, ze świeżo zdiagnozowaną chorobą Gravesa-Basedowa, 16 dziewczynek i 6 chłopców w wieku od 3 lat do 18 lat
- grupa C - kontrolna, 20 zdrowych dzieci w stanie eutyreozy klinicznej i hormonalnej, 11 dziewczynek i 9 chłopców w wieku od 2 lat do 18 lat

Na wykonanie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu nr 396/07.

3.2. Wykonane badania

W ramach badania przedmiotowego wykonano pomiary antropometryczne tj. wzrost i masę ciała. Na ich podstawie wyliczono:

- wskaźnik masy ciała BMI według wzoru:

$$\text{wskaźnik BMI} = \frac{\text{masa ciała (kg)}}{[\text{wysokość ciała (m)}]^2}$$

Wartości BMI wyraża się w kg/m^2 . Dla dzieci wartości BMI odnosi się do siatek centylowych dla wieku i płci, opracowanych w Instytucie Matki i Dziecka przez Palczewska i Niedźwiecką^[183].

- BMI-SDS - ocenę BMI odniesiono do wartości średniej BMI i wielokrotności odchylenia standardowego właściwego dla danej populacji SDS. Wartością graniczną jest wartość wskaźnika BMI-SDS powyżej dwóch odchyżeń standardowych dla wieku i płci dzieci i młodzieży do 18 roku życia
- oraz wskaźnik Cole'a (CI) wyrażony w procentach (%)

$$CI = \frac{BMI \text{ pacjenta}}{BMI \text{ dla 50 c standard}} \times 100$$

Wartości wskaźnika Cole'a wyrażone w procentach służą do określania stanu odżywienia dzieci i młodzieży.

U wszystkich pacjentów oznaczono stężenia w surowicy krwi następujących parametrów:

1. Hormony tarczycy metodą MEIA (*Microparticle Enzyme Immunoassay*), analizatorem AxSYM firmy Abbott, w SK im. K. Jonschera UM w Poznaniu w Centralnym Laboratorium w ramach badań rutynowych
 - wolna tyroksyna (fT4)
 - wolna trijodotyronina (fT3)
 - hormon tyreotropowy (TSH)
2. Przeciwciała przeciwarczycowe metodą radioimmunologiczną RIA (*Radioimmuno Assay*) i radioreceptorową RRA (*Radioreceptor Assay*), zestawami firmy Brahms w SK im. K. Jonschera UM w Poznaniu w Centralnym Laboratorium w ramach badań rutynowych
 - przeciwciała przeciw peroksydazie tarczycowej (ATPO)
 - przeciwciała przeciw tyreoglobulinie (ATG)
 - przeciwciała przeciw receptorowi TSH (TRAb)
3. Stężenie cytokin w grupie z niedoczynnością tarczycy (hipoT), nadczynnością tarczycy (hiperT) oraz w grupie kontrolnej oznaczono bezpośrednio po zdiagnozowaniu klinicznym pacjentów, przed wprowadzeniem jakiegokolwiek leczenia. Badanie wykonano w Pracowni Endokrynologii Molekularnej Kliniki Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej UM w Poznaniu, za pomocą testów laboratoryjnych ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*):
 - IL-6, IL-1 β , TNF- α , TRAIL, sFasL, firmy BenderMedSystems
 - OPG, RANKL firmy Biomedica

Badania obrazowe tarczycy wykonano przy pomocy aparatu ultrasonograficznego ALOKA 500SS z głowicą 7,5 MHz (do XII 2009) oraz SSD 3500SX z głowicą o zmiennej częstotliwości 7,5 – 14 MHz (od XII 2009).

3.3. Badania laboratoryjne

Krew po rannym pobraniu na czczo, wirowano w ciągu 30 minut od momentu jej pobrania w wirówce z chłodzeniem przez 20 minut, przy 3000 obrotów/min, a następnie surowice rozdzielono na mniejsze porcje, mrożono i przechowywano w temp. -80°C do czasu wykonania oznaczeń.

Przed wykonaniem oznaczeń badane surowice rozmrożono, a odczynniki do wykonania oznaczenia pozostawiono w temp. pokojowej przez 30 min.

3.3.1. Oznaczenia hormonalne

Stan czynnościowy tarczycy określono poprzez oznaczenie hormonów tarczycy. Wykonane badania hormonalne u dzieci obejmowały oznaczenie w ich surowicy krwi TSH oraz fT4 i fT3. Badania te pozwalały określić stan czynnościowy pacjenta.

Wartości referencyjne stężeń hormonów przedstawiają się następująco:

- fT4: 0,71-1,85 ng/dL;
Czułość metody 0,4 ng/ml. Precyzja wewnątrz testu 5,9 CV% i pomiędzy testami wynosi 5,2 CV%
- fT3: 1,45-3,48 pg/mL;
Czułość metody 1,1 pg/ml. Precyzja metody <12 CV% dla niskiej kontroli i <8 CV% dla wysokiej kontroli
- TSH: 0,49-4,67 µIU/mL;
Czułość analityczna zestawu wynosi 0,006 µIU/mL. Precyzję wewnątrz metody ustalono na <8 CV% i <14,6 CV%. mierzone w kilku różnych panelach.

3.3.2. Oznaczenia przeciwciał przeciwarczycowych

Celem oceny zaburzeń immunologicznych w surowicy krwi badanych dzieci oznaczono stężenie przeciwciał przeciwarczycowych. U pacjentów z przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy najczęściej występują przeciwciała przeciw tyreoperoksydazowe (ATPO) oraz rzadziej przeciwciała przeciwtyreoglobulinowe (ATG)^[57].

Pacjentom z chorobą Gravesa-Basedowa oznaczono również przeciwciała przeciw receptorowi TSH (TRAb).

Metoda oznaczania ATPO w surowicy dzieci

Oznaczanie ATPO wykonano w oparciu o metodę RIA, zestawem firmy BRAHMS (Berlin, Niemcy), według zaleceń producenta. Wybrany zestaw jest testem radioimmunologicznym kompetycyjnym, stosowanym do ilościowego oznaczania autoprzeciwciał ATPO w surowicy ludzkiej z wykorzystaniem techniki opłaszczonych probówek. W zestawie stosuje się enzymatycznie aktywną, naturalną peroksydazę tarczycową pochodzącą z ludzkich tarczyc. Naturalna struktura antygeny TPO gwarantuje prawidłowe rozpoznanie wszystkich klas i podklas przeciwciał skierowanych przeciwko naturalnej strukturze TPO. Objętość krwi potrzebna do wykonania oznaczenia wynosi 20 μ l. Badaną próbkę krwi po pobraniu odwirowano, uzyskaną po odcignięciu surowicę przechowywano w temperaturze - 80°C do czasu wykonania oznaczeń.

Zasada testu

Podczas inkubacji monoklonalne mysie przeciwciała anti-h-TPO związane z fazą stałą i enzymatycznie aktywna naturalna peroksydaza tarczycowa TPO pochodząca z ludzkiego gruczołu tarczowego, tworzą kompleks ze znakowanym izotopem jodu I^{125} monoklonalnym przeciwciałem ATPO. Autoprzeciwciała ATPO z próbek surowicy pacjenta oraz ze standardów współzawodniczą z monoklonalnymi przeciwciałami anti-TPO unieruchomionymi na wewnętrznej ściance probówki o miejsca wiązania na cząsteczce TPO. Wysokie stężenia przeciwciał ATPO w badanej surowicy ogranicza wiązanie znacznika z wewnętrzną powierzchnią na ściankach probówek fazy stałej. Zmierzona aktywność jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia przeciwciał w badanej próbce surowicy. Po inkubacji, ilość ludzkiego TPO i znakowane I^{125} ATPO (znacznik) niezwiązane z probówką, zostają usunięte przez aspirację lub dekantację fazy płynnej. W dalszej kolejności zostaje zmierzona radioaktywność związanego w probówce znacznika. Pomiar wykonano licznikiem scyntylicyjnym promieniowania gamma Wizard 1470 Automatic Gamma Counter firmy Wallac, w ciągu 60 sekund. Wartości ATPO odczytano z krzywej standardowej. Do zestawu dołączone są dwie ludzkie surowice wzorcowe o znanym stężeniu przeciwciał przeciwtarczycowych ATPO.

Wartości >60 IU/ml zostały ustalone jako pozytywne. Precyzja metody między testami wynosi 4,5 CV% a wewnątrz testu 9,1 CV%. Czułość analityczna wynosi 5,5 IU/ml, oparta na 40-krotnym pomiarze standardu 0.

Metoda oznaczania ATG w surowicy dzieci

Oznaczanie ATG wykonano w oparciu o metodę RIA, zestawem firmy BRAHMS (Berlin, Niemcy), według zaleceń producenta. Wybrany zestaw jest testem radioimmunologicznym kompetycyjnym, stosowanym do ilościowego oznaczania autoprzeciwciał ATG w surowicy ludzkiej z wykorzystaniem techniki opłaszczonych probówek. W zestawie stosuje się oczyszczoną naturalną tyreoglobulinę, pochodzącą z ludzkich tarczyc oraz oczyszczone chromatograficznie ludzkie poliklonalne autoprzeciwciała przeciwko tyreoglobulinie ATG, pozyskane z surowicy pacjentów z autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy, zastosowane w teście jako przeciwciała fazy stałej. Zapewnia to możliwość wykrycia wszystkich klas i podklas przeciwciał. Objętość krwi potrzebna do wykonania oznaczenia wynosi 20 µl. Badaną próbkę krwi po pobraniu odwirowano, uzyskaną po odciążeniu surowicę przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania oznaczeń.

Zasada testu

Podczas inkubacji związane z fazą stałą i unieruchomione na wewnętrznej ścianie probówek poliklonalne ludzkie autoprzeciwciała ATG współzawodniczą z przeciwciałami zawartymi w próbce badanej surowicy o te same determinanty antygenowe na cząsteczkach TG znakowanych radioaktywnym I¹²⁵, będących znacznikiem reakcji immunologicznej. Wysokie stężenie przeciwciał ATG w badanej surowicy ogranicza wiązanie znakowanej I¹²⁵ tyreoglobuliny z przeciwciałami unieruchomionymi na ściankach probówek fazy stałej. Zmierzona aktywność jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia przeciwciał ATG w badanej próbce surowicy. Po inkubacji, kompleksy autoprzeciwciała ATG badanej próbki i znacznika niezwiązane z probówką, zostają usunięte w trakcie płukania. W dalszej kolejności zostaje zmierzona radioaktywność związanego w próbce znacznika. Pomiar wykonano licznikiem scyntylicyjnym promieniowania gamma Wizard 1470 Automatic Gamma Counter firmy Wallac - w ciągu 60 sekund. Próbki o znanych stężeniach ATG służą do sporządzenia krzywej standardowej, z której odczytuje się wartości stężenia ATG znajdujących się w surowicy pacjentów. Standardy są kalibrowane na podstawie międzynarodowego wzorca TG MRC65/93. Do zestawu dołączone są dwie ludzkie surowice wzorcowe o znanym stężeniu przeciwciał przeciwytyreoglobulinowych ATG.

Wartości >60 IU/ml zostały ustalone jako pozytywne. Precyzja metody między testami wynosi 7,5 CV% a wewnątrz testu 5,5 CV%. Czulość analityczna wynosi 5,5 IU/ml, oparta na 40-krotnym pomiarze standardu 0.

Metoda oznaczania TRAb w surowicy dzieci

Oznaczanie TRAb wykonano w oparciu o metodę RRA, zestawem firmy BRAHMS (Berlin, Niemcy), według zaleceń producenta. Jest to test radioreceptorowy, stosowany do ilościowego oznaczania w surowicy ludzkiej przeciwciał przeciwko receptorowi ludzkiej tyreotropiny TSH z wykorzystaniem techniki opłaszczonych probówek. W zestawie stosuje się ludzki rekombinowany receptor TSH, którym pokryto wewnętrzną powierzchnię probówek reakcyjnych. Znacznikiem jest znakowana izotopem jodu I^{125} bydlęca tyreotropina TSH. Objętość krwi potrzebna do wykonania oznaczenia wynosi 100 μ l. Badaną próbkę krwi po pobraniu odwirowano, uzyskaną po odciążeniu surowicę przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania oznaczeń.

Zasada testu

Zasada oznaczenia oparta jest na zdolności wiązania przeciwciał przeciwireceptorowych z receptorem tyreotropiny, unieruchomionym na wewnętrznej ścianie probówek reakcyjnych. Wiązanie to zapobiega łączeniu się znakowanego I^{125} hormonu tyreotropowego ze swoistym receptorem. W pierwszym etapie testu, w którym dochodzi do wiązania przeciwciał z receptorem tyreotropiny inkubuje się próbki pacjenta o nieznanym stężeniu TRAb oraz wzorce o znanym stężeniu TRAb w probówkach pokrytych rekombinowanym ludzkim receptorem TSH. Po wstępnym przemyciu, w dalszej kolejności następuje wiązanie znacznika, którym jest znakowana I^{125} bydlęca tyreotropina, z pozostałą ilością wolnych receptorów TSHR na ścianie probówki reakcyjnej. W trakcie drugiego płukania następuje usuwanie niezwiązanej znakowanej tyreotropiny. Związaną na powierzchni probówki znakowaną tyreotropinę mierzy się za pomocą licznika scyntylicyjnego promieniowania gamma. Pozim aktywności próbki jest odwrotnie proporcjonalny do ilości TRAb w badanym materiale. Stężenie TRAb w próbce pacjenta oblicza się z krzywej standardowej próbek o znanej koncentracji TRAb. Standardy są kalibrowane na podstawie międzynarodowego wzorca 90/672, zgodnie ze standardami WHO. Do zestawu dołączone są dwie ludzkie surowice wzorcowe o znanym stężeniu przeciwciał przeciwireceptorowych TRAb.

Wartości stężenia TRAb <1 U/l zostały ustalone jako negatywne. Wartości stężenia TRAb $>1,5$ U/l zdefiniowano jako pozytywne. Stężenie zawarte pomiędzy 1 a 1,5 U/l uznaje się za wątpliwe, a pacjenci z tymi wynikami powinni być monitorowani w kierunku autoimmunologicznej choroby tarczycy. Precyzja między testami wynosi 15,4 CV%, a wewnątrz testu 15,8 CV%. Czułość analityczna wynosi 0,3 U/l oparta na 10-krotnym pomiarze standardu 0.

3.4. Metody oznaczania cytokin

Oznaczenie stężenia czynników prozapalnych, proapoptotycznych i antyapoptotycznych w badanych grupach dzieci: z niedoczynnością tarczycy (hipoT), nadczynnością tarczycy (hiperT) i w grupie kontrolnej w surowicy krwi, wykonano tuż po zdiagnozowaniu klinicznym, przed wprowadzeniem jakiegokolwiek leczenia. Badanie wykonano w Pracowni Endokrynologii Molekularnej Kliniki Endokrynologii i Reumatologii Dziecięcej UM w Poznaniu.

Wybrane cytokiny oznaczano w oparciu o metodę immunoenzymatyczną ELISA, z zastosowaniem zestawów do ilościowego oznaczania w surowicy krwi firmy BenderMedSystem ściśle wg zaleceń producenta:

- IL-1 β BMS 224/2
- IL-6 BMS 213/2
- TNF- α tot. BMS 2034
- TRAIL BMS 2004
- sFasL BMS 260/2

i Biomedica ściśle wg zaleceń producenta:

- OPG BI-20402
- sRANKL BI-20452

Metoda oznaczania IL-1 β , IL-6, TNF- α total, TRAIL, sFasL

Mikropłytki reakcyjne do oznaczeń ELISA zestawami firmy BenderMedSystem z opłaszczonym monoklonalnym przeciwciałem, specyficznym dla danej cytokiny inkubowano z analizowaną próbką surowicy pacjenta. Cytokiny zawarte w badanym materiale wiązały się specyficznie ze swoistymi przeciwciałami I rzędu, unieruchomionymi na powierzchni mikrostudzienek reakcyjnych, tworząc fazę stałą. Po dodaniu konjugatu biotyna-anty-ludzkie przeciwciało, następowało wiązanie utworzonego kompleksu z przeciwciałem II rzędu. W kolejnym etapie po wypłukaniu zbędnych składników w trakcie inkubacji z enzymem peroksydazą chrzanową HRP sprzężoną ze streptawidyną, otrzymano kompleks immunologiczny o strukturze kanapkowej: opłaszczone na płycie przeciwciało monoklonalne I rzędu – badana cytokina – przeciwciało monoklonalne II rzędu - enzym HRP. Po usunięciu niezwiązanych z kompleksem immunologicznym substancji, do układu reakcyjnego dodano roztwór substratu dla enzymu znacznikowego - tetrametylobenzydynę (TMB). W wyniku reakcji enzym–substrat, powstała ilość kolorowego produktu, wprost proporcjonalna do ilości

cytokiny oznaczanej w badanej próbce, oraz dodanych standardów, tworzących krzywą kalibracyjną. Zatrzymanie reakcji nastąpiło przez dodanie 1 M roztworu kwasu fosforowego.

Do płukania mikropłytek zastosowano płuczkę automatyczną ETI-System Washer firmy DiaSorin. Absorbancję odczytano za pomocą czytnika mikropłytek ELx 800 firmy BioTek Instruments (USA) przy długości fali 450 nm z filtrem referencyjnym 620 nm. Test poddano ewaluacji za pomocą programu komputerowego Gen 5 przy użyciu krzywej 4 PL. Wartości absorbancji przeliczano na jednostki stężenia badanego parametru w oparciu o wielopunktową krzywą kalibracyjną.

Oznaczenia stężeń w surowicy IL-1 β , IL-6, TNF- α , TRAIL, wyrażano w pg/ml, a sFasL w ng/ml, OPG i ampli sRANKL w pmol/l.

Parametry reakcji ELISA dla poszczególnych cytokin podano w Tabeli 3.

Tabela 3. Parametry reakcji ELISA zestawów BenderMedSystem i Biomedica

Cytokina	Limit detekcji	Precyzja w serii CV (%)	Precyzja między seriami CV (%)
IL-1 β	0,32 pg/ml	8,6	5,1
IL-6	0,92 pg/ml	5,2	3,4
TNF- α tot	5,0 pg/ml	8,1	7,7
TRAIL	5,4 pg/ml	7,7	6,5
sFasL	0,07 ng/ml	6,1	7
OPG	0,14 pmol/l	10	8
ampli sRANKL	0,02 pmol/l	9	6

Metoda oznaczania OPG

Oznaczenie stężenia osteoprotegeryny w surowicy krwi wykonano w oparciu o metodę immunoenzymatyczną ELISA, z zastosowaniem komercyjnych zestawów do ilościowego oznaczenia osteoprotegeryny firmy Biomedica (Austria, Vienna), numer katalogowy: BI-20402, wg zaleceń producenta. Zestaw wykrywa obie formy, monomer i dimer OPG, włączając OPG związaną z ligandem RANKL. Zestaw przygotowany jest do oznaczania OPG w ludzkiej surowicy, osoczu EDTA, osoczu z heparyną oraz hodowli komórkowej. Czas inkubacji wynosi odpowiednio 18-24 godziny, 1 godzina, 20 min. Objętość krwi potrzebna do wykonania oznaczenia wynosi 50 μ l. Badaną próbkę krwi po pobraniu odwirowano, uzyskaną po odciążeniu surowicę przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania oznaczeń.

Technika wykonania

Przed wykonaniem oznaczeń badane surowice rozmrożono, a odczynniki do wykonania oznaczenia pozostawiono w temp. pokojowej przez 30 min. W pierwszym etapie do dołków płytek opłaszczonych monoklonalnym ludzkim przeciwciałem przeciw osteoprotegerynie dodaje się 100 µl buforu, 50 µl kalibratorów, surowicy dzieci z hipoT i hiperT oraz surowicy dzieci z grupy kontrolnej. Następnie dodaje się poliklonalne przeciwciało anti-OPG znakowane biotyną. W wyniku reakcji powstaje kompleks immunologiczny osteoprotegeryna-przeciwciało przeciw osteoprotegerynie. Płytkę inkubuje się przez 24 godziny w temperaturze +4°C. Po zakończeniu inkubacji, płytkę należy dokładnie przepłukać buforem w celu usunięcia nadmiaru niezwiązanych kompleksów. W kolejnym etapie po dodaniu 200 µl konjugatu streptawidyna-HRPO przeprowadza się inkubację przez 1 godzinę w temp. pokojowej ok. 20°C. Po powtórnym 5-krotnym przemyciu płytki i dokładnym usunięciu resztek buforu płuczącego, do każdego dołka dodaje się 200 µl roztworu substratu. Po 20 minutach inkubacji w ciemności, w temp. pokojowej, reakcję należy zatrzymać, przez dodanie 50 µl roztworu hamującego reakcję enzymatyczną.,

Do płukania mikroplatek zastosowano płuczkę automatyczną ETI-System Washer firmy DiaSorin. Absorbancję odczytano za pomocą czytnika mikroplatek ELX 800 firmy BioTek przy długości fali 450 nm z filtrem referencyjnym 620 nm. Test poddano ewaluacji za pomocą programu komputerowego Gen 5 przy użyciu krzywej 4 PL. Limit detekcji wynosi 0,14 pmol/l. Precyzja metody wewnątrzoznaczeniowa wynosi 10 CV%, a międzyoznaczeniowa 8 CV%.

Wartości referencyjne podane przez producenta wynoszą: mediana 1,8 pmol/l (dla n=1134 i wieku 19-96 lat).

Oznaczanie amplii sRANKL

Oznaczenie stężenia liganda rozpuszczalnego receptora aktywującego jądrocy czynnik kappaB (który jest również ligandem osteoprotegeryny) w surowicy krwi, wykonano w oparciu o metodę immunoenzymatyczną ELISA, z zastosowaniem komercyjnych zestawów do ilościowego oznaczenia amplii sRANKL firmy Biomedica (Austria, Vienna), numer katalogowy: BI-20452 wg zaleceń producenta. Zestaw przygotowany jest do oznaczania sRANKL w ludzkiej surowicy, osoczu EDTA, osoczu z heparyną oraz hodowli komórkowej. Czas inkubacji wynosi odpowiednio 18-24 godziny, 1 godzina, 45 min. Ponieważ stężenie sRANKL jest zwykle dość niskie w tym teście ELISA stosuje się dodatkowy układ amplifikujący. Objętość krwi potrzebna do wykonania oznaczenia wynosi 100 µl. Badaną próbkę krwi po pobraniu odwirowano, uzyskaną po odciążeniu surowicę przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania oznaczeń.

Technika wykonania

Przed wykonaniem oznaczeń badane surowice rozmrożono, a odczynniki do wykonania oznaczenia pozostawiono w temp. pokojowej przez 30 min. W teście wykorzystano technikę opłaszczonych płytek. W pierwszym etapie do dołków płytek opłaszczonych ludzką, rekombinowaną osteoprotegeryną (receptorem dla RANKL), dodano 100 µl standardów, surowicy pacjentów hipoT i hiperT oraz surowicy dzieci z grupy kontrolnej. Poliklonalne znakowane biotyną przeciwciała anti-sRANKL zastosowano jako przeciwciała detekcyjne. W wyniku reakcji powstaje kompleks immunologiczny o osteoprotegeryna – rozpuszczalny ligand receptora aktywującego czynnik jądrowy kappaB - poliklonalne przeciwciała anti-sRANKL. Płytkę inkubuje się przez 24 godziny w temperaturze pokojowej +18-26°C. Po zakończeniu inkubacji płytkę należy dokładnie przepłukać buforem, w celu usunięcia nadmiaru niezwiązanych kompleksów. W kolejnym etapie po dodaniu 200 µl konjugatu (streptawidyna-fosfataza alkaliczna) przeprowadza się inkubację przez 1 godzinę w temp. pokojowej ok.18-26°C. Po powtórnym 5-krotnym przemyciu płytki i dokładnym usunięciu resztek buforu płuczącego, do każdego dołka dodaje się 100 µl roztworu amplifikującego A (roztwór soli nieorganicznych i zbuforowanego enzymu) oraz 100 µl roztworu amplifikującego B (stabilizowany roztwór NADPH) wzmacniających reakcję i po 45 minutach inkubacji w ciemności, w temp. pokojowej, reakcję należy zatrzymać, przez dodanie 50 µl roztworu hamującego reakcję enzymatyczną. Stężenia próbek odczytano z krzywej standardowej.

Do płukania mikropłytek zastosowano płuczkę automatyczną ETI-System Washer firmy DiaSorin. Absorbancję odczytano za pomocą czytnika mikropłytek ELX 800 firmy BioTek przy długości fali 490 nm z filtrem referencyjnym 620 nm. Test poddano ewaluacji za pomocą programu komputerowego Gen 5 przy użyciu krzywej 4 PL. Precyzja metody wewnątrztestowa wynosi 9 CV% a międzytestowa 6 CV%. Według podanych przez producenta informacji, poziom detekcji testu wynosi 0,02 pmol/l.

Zakres wartości referencyjnych podanych przez producenta wynosi dla kobiet: mediana 0,37 pmol/l (n=635) i dla mężczyzn mediana 0,46 pmol/l (n=394).

Materiał biologiczny do wykonanych oznaczeń był pobierany jednocześnie z pobieraniem krwi do badań niezbędnych w ramach prowadzonej diagnostyki i leczenia.

3.5. Zastosowane metody analizy statystycznej danych

Analizę statystyczną danych wykonano w programach komputerowych SPSS 17.0 (SPSS Inc., USA) oraz GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) w środowisku Windows na platformie PC. Zgodność testowanych rozkładów zmiennych z rozkładem normalnym (ze względu na obserwowane licznosci $n < 100$) badano testem Shapiro-Wilk'a (S-W). W celu porównania istotności różnic w dwóch grupach w zależności od rozkładu zastosowano test t-Student'a (t-test) dla zmiennych niepowiązanych (jednorodność wariancji badano testem Levene'a) gdy stwierdzano rozkład zgodny z normalnym oraz test U Mann'a-Whitney'a (M-W) w pozostałych przypadkach. Przy porównaniach różnic między trzema grupami wykorzystano analizę wariancji ANOVA i test post-hoc Newman'a-Keuls'a (N-K) w przypadku rozkładu normalnego lub test Kruskal'a-Wallis'a i test post-hoc Dunn'a w przypadku braku zgodności badanych zmiennych z rozkładem normalnym. Analizując dane w skali nominalnej stosowano test Chi-kwadrat Pearson'a. Dla oszacowania zależności między zmiennymi, ze względu na przewagę zmiennych, dla których stwierdzono brak zgodności z rozkładem normalnym, obliczono współczynnik korelacji r-Spearman'a i oceniono jego istotność. Celem oceny hipotetycznej możliwości wykorzystania stężeń badanych cytokin jako markerów nadczynności lub niedoczynności tarczycy wykreślono krzywe ROC (*Receiver Operating Characteristic*) i obliczono pole powierzchni pod krzywą (AUC, *Area Under the Curve*). Wyznaczono także punkty odcięcia (*Cut-Off*) dyskryminujące grupy z optymalną czułością i swoistością przy pomocy statystyki J-Youden'a. W całej analizie za znamienne statystycznie przyjęto wartości $p < 0,05$. Wyniki przedstawiono w postaci tabel (licznosci, wartości procentowe, średnia, mediana, odchylenie standardowe [SD], rozstęp kwartylowy [IQR, *Interquartile Range*], (minimum, maksimum), histogramów licznosci z krzywą normalności oraz – dla testów nieparametrycznych - wykresów skrzynkowych typu ramka-wąsy (*Boxplot*) przedstawiających linię mediany, ramkę równą rozstępowi kwartylowemu oraz wąsy dla wartości minimalnych i maksymalnych, z pominięciem wartości odstających (*Outliers*) - powyżej 1,5. rozstępu kwartylowego od mediany - oraz ekstremalnych (*Extremes*) - powyżej 3 IQR od mediany. Dla zmiennych o rozkładzie normalnym w statystykach opisowych wykorzystano średnią i odchylenie standardowe, natomiast w przypadku braku zgodności z rozkładem normalnym – medianę i rozstęp kwartylowy. Graficznie wyniki testów parametrycznych przedstawiono na wykresach – słupkach błędów (*Error Bar*), przedstawiających średnią i 95% przedział ufności (PU) badanej zmiennej. Korelacje przedstawiono na wykresach rozrzutu (*Scatter Plots*) z wykreśloną krzywą regresji. Na wykresach i w tabelach przyjęto następujące oznaczenia symboliczne: ns – brak istotności statystycznej; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$.

4. WYNIKI

4.1. Charakterystyka badanych grup pacjentów

Grupa badana i grupa kontrolna

Do badania włączono 22 pacjentów z niedoczynnością tarczycy (hipoT), w wieku od 6 do 16 lat, w tym 18 dziewczynek (81,8%) i 4 chłopców (18,2%) oraz 22 pacjentów z nadczynnością tarczycy (hiperT) w wieku od 3 do 18 lat, w tym 16 dziewczynek (72,7%) i 6 chłopców (27,3%). Grupę kontrolną stanowiło 20 dzieci zdrowych dzieci – 11 dziewczynek (55%) i 9 chłopców (45%) – w wieku od 2 do 18 lat. W sumie przebadano 64 dzieci (100%).

Rozkłady badanych parametrów i wykonanych oznaczeń w badanych grupach pacjentów

Zgodność rozkładów badanych parametrów z rozkładem normalnym ocenionych na podstawie testu Shapir'o-Wilk'a przedstawiono w poniższych tabelach. Testowano również rozkłady podgrup względem płci. Hipotezę o rozkładzie normalnym przyjęto dla $p > 0,05$; zmienne o rozkładzie zgodnym z rozkładem normalnym wyróżniono kolorem zielonym, a zmienne o rozkładzie niezgodnym z rozkładem normalnych - kolorem czerwonym. Wyniki przedstawiono w Tabelach 4-7. W Tabeli 4 przedstawiono zastosowane testy normalności rozkładu i istotności różnic między trzema grupami badanymi:

Tabela 4. Testy normalności rozkładu i istotności różnic pomiędzy badanymi grupami

Testy normalności rozkładu / testy istotności różnic między grupami						
	Grupa	Shapiro-Wilk			Różnice	
		n	Istotność (p)	Zgodność z rozkładem normalnym	Zastosowany test	Post-hoc
Wiek [lata]	hiperT	22	0,011	nie	Kruskal-Wallis (K-W)	Dunn
	hipoT	22	0,755	tak		
	kontrola	20	0,126	tak		
BMI [kg/m ²]	hiperT	22	0,330	tak	Kruskal-Wallis (K-W)	Dunn
	hipoT	22	0,012	nie		
	kontrola	20	0,084	tak		
BMI SDS	hiperT	22	0,889	tak	Kruskal-Wallis (K-W)	Dunn
	hipoT	22	0,019	nie		
	kontrola	20	0,037	nie		

wskaźnik Cole'a [bezwgl.]	hiperT	22	0,940	tak	ANOVA	Newman-Keuls (N-K)
	hipoT	22	0,061	tak		
	kontrola	20	0,100	tak		
TSH [μ IU/ml]	hiperT	22	0,000	nie	Kruskal-Wallis (K-W)	Dunn
	hipoT	22	0,000	nie		
	kontrola	20	0,023	nie		
fT4 [ng/dl]	hiperT	22	0,817	tak	ANOVA	Newman-Keuls (N-K)
	hipoT	22	0,387	tak		
	kontrola	20	0,599	tak		
fT3 [pg/ml]	hiperT	22	0,304	tak	ANOVA	Newman-Keuls (N-K)
	hipoT	22	0,961	tak		
	kontrola	20	0,434	tak		
TRAb [IU/l]	hiperT	22	0,002	nie	Kruskal-Wallis (K-W)	Dunn
	hipoT	16	0,052	tak		
	kontrola	7	0,880	tak		
ATG [IU/ml]	hiperT	22	0,000	nie	Kruskal-Wallis (K-W)	Dunn
	hipoT	20	0,000	nie		
	kontrola	20	0,027	nie		
ATPO [IU/ml]	hiperT	22	0,000	nie	Kruskal-Wallis (K-W)	Dunn
	hipoT	22	0,000	nie		
	kontrola	20	0,002	nie		
IL-6 [pg/ml]	hiperT	22	0,000	nie	Kruskal-Wallis (K-W)	Dunn
	hipoT	22	0,000	nie		
	kontrola	20	0,006	nie		
TNF- α [pg/ml]	hiperT	22	0,042	nie	Kruskal-Wallis (K-W)	Dunn
	hipoT	22	0,000	nie		
	kontrola	20	0,000	nie		
IL-1 β [pg/ml]	hiperT	22	0,357	tak	Kruskal-Wallis (K-W)	Dunn
	hipoT	22	0,000	nie		
	kontrola	20	0,008	nie		
TRAIL [pg/ml]	hiperT	22	0,014	nie	Kruskal-Wallis (K-W)	Dunn
	hipoT	22	0,016	nie		
	kontrola	20	0,012	nie		
OPG [pmol/l]	hiperT	22	0,207	tak	ANOVA	Newman-Keuls (N-K)
	hipoT	22	0,777	tak		
	kontrola	20	0,256	tak		
sRANKL [pmol/l]	hiperT	22	0,000	nie	Kruskal-Wallis (K-W)	Dunn
	hipoT	22	0,000	nie		
	kontrola	20	0,000	nie		
sFasL [ng/ml]	hiperT	19	0,226	tak	Kruskal-Wallis (K-W)	Dunn
	hipoT	11	0,549	tak		
	kontrola	15	0,022	nie		

W Tabeli 5 przedstawiono zastosowane testy normalności rozkładu i istotności różnic w grupie dzieci z **nadczynnością** tarczycy z podziałem ze względu na płeć:

Tabela 5. Testy normalności rozkładu i istotności różnic względem płci w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy

Grupa dzieci z nadczynnością tarczycy - testy normalności rozkładu / testy istotności różnic między grupami					
	Grupa	Shapiro-Wilk			Różnice
		n	Istotność (p)	Zgodność z rozkładem normalnym	Zastosowany test
Wiek [lata]	dziewczynki	16	0,026	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	6	0,257	tak	
BMI [kg/m ²]	dziewczynki	16	0,137	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	6	0,471	tak	
BMI SDS	dziewczynki	16	0,976	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	6	0,633	tak	
wsk. Cole'a [bezwgl.]	dziewczynki	16	0,936	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	6	0,325	tak	
TSH [μ IU/ml]	dziewczynki	16	0,000	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	6	0,406	tak	
fT4 [ng/dl]	dziewczynki	16	0,723	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	6	0,575	tak	
fT3 [pg/ml]	dziewczynki	16	0,758	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	6	0,177	tak	
TRAb [IU/l]	dziewczynki	16	0,003	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	6	0,179	tak	
ATG [IU/ml]	dziewczynki	16	0,000	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	6	0,000	nie	
ATPO [IU/ml]	dziewczynki	16	0,000	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	6	0,583	tak	
IL-6 [pg/ml]	dziewczynki	16	0,000	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	6	0,001	nie	
TNF- α [pg/ml]	dziewczynki	16	0,079	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	6	0,438	tak	
IL-1 β [pg/ml]	dziewczynki	16	0,280	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	6	0,461	tak	
TRAIL [pg/ml]	dziewczynki	16	0,286	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	6	0,312	tak	
OPG [pmol/l]	dziewczynki	16	0,469	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	6	0,476	tak	
sRANKL [pmol/l]	dziewczynki	16	0,000	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	6	0,243	tak	
sFasL [ng/ml]	dziewczynki	15	0,073	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	4	0,529	tak	

W Tabeli 6 przedstawiono zastosowane testy normalności rozkładu i istotności różnic w grupie dzieci z **niedoczynnością** tarczycy z podziałem ze względu na płeć:

Tabela 6. Testy normalności rozkładu i istotności różnic względem płci w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy

Grupa dzieci z niedoczynnością tarczycy - testy normalności rozkładu / testy istotności różnic między grupami					
	Grupa	Shapiro-Wilk			Różnice
		n	Istotność (p)	Zgodność z rozkładem normalnym	Zastosowany test
Wiek [lata]	dziewczynki	18	0,913	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	4	0,814	tak	
BMI [kg/m ²]	dziewczynki	18	0,008	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	4	0,650	tak	
BMI SDS	dziewczynki	18	0,016	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	4	0,455	tak	
wsk. Cole'a [bezwgl.]	dziewczynki	18	0,082	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	4	0,233	tak	
TSH [μIU/ml]	dziewczynki	18	0,000	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	4	0,060	tak	
fT4 [ng/dl]	dziewczynki	18	0,366	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	4	0,926	tak	
fT3 [pg/ml]	dziewczynki	18	0,974	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	4	0,672	tak	
TRAb [IU/l]	chłopcy	2	n.dot.	n.dot.*	Mann-Whitney (MW)
	dziewczynki	14	0,206	tak	
ATG [IU/ml]	dziewczynki	16	0,000	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	4	0,038	nie	
ATPO [IU/ml]	dziewczynki	18	0,000	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	4	0,001	nie	
IL-6 [pg/ml]	dziewczynki	18	0,000	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	4	0,101	tak	
TNF-α [pg/ml]	dziewczynki	18	0,000	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	4	0,031	nie	
IL-1β [pg/ml]	dziewczynki	18	0,000	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	4	0,245	tak	
TRAIL [pg/ml]	dziewczynki	18	0,036	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	4	0,065	tak	
OPG [pmol/l]	dziewczynki	18	0,627	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	4	0,783	tak	
sRANKL [pmol/l]	dziewczynki	18	0,000	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	4	0,933	tak	
sFasL [ng/ml]	chłopcy	1	n.dot.	n.dot.*	Mann-Whitney (MW)
	dziewczynki	10	0,698	tak	

* dla licznosci n=1 i n=2 brak mozliwosci obliczenia statystyki, zalozeno koniecznosc zastosowania testu nieparametrycznego

W Tabeli 7 przedstawiono zastosowane testy normalności rozkładu i istotności różnic w grupie **kontrolnej** z podziałem ze względu na płeć:

Tabela 7. Testy normalności rozkładu i istotności różnic względem płci w grupie kontrolnej

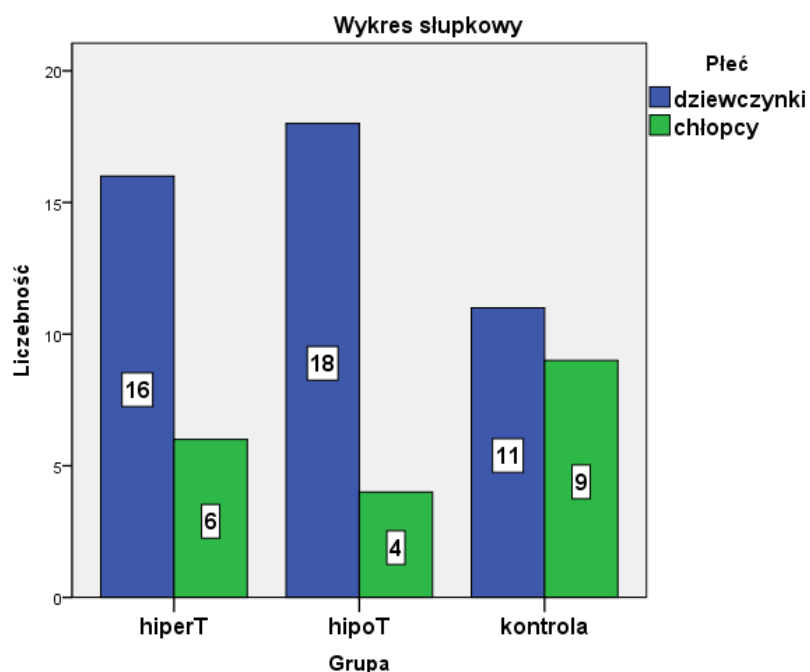
Testy normalności rozkładu / testy istotności różnic między grupami					
	Płeć	Shapiro-Wilk			Różnice
		n	Istotność (p)	Zgodność z rozkładem normalnym	Zastosowany test
Wiek [lata]	dziewczynki	11	0,098	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	9	0,822	tak	
BMI [kg/m ²]	dziewczynki	11	0,218	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	9	0,353	tak	
BMI SDS	dziewczynki	11	0,301	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	9	0,195	tak	
wsk. Cole'a [bezwgl.]	dziewczynki	11	0,384	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	9	0,494	tak	
TSH [μIU/ml]	dziewczynki	11	0,008	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	9	0,404	tak	
fT4 [ng/dl]	dziewczynki	11	0,516	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	9	0,995	tak	
fT3 [pg/ml]	dziewczynki	11	0,874	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	9	0,328	tak	
TRAb [IU/l]	dziewczynki	4	0,900	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	3	0,637	tak	
ATG [IU/ml]	dziewczynki	11	0,222	tak	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	9	0,041	nie	
ATPO [IU/ml]	dziewczynki	11	0,046	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	9	0,007	nie	
IL-6 [pg/ml]	dziewczynki	11	0,144	tak	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	9	0,000	nie	
TNF-α [pg/ml]	dziewczynki	11	0,001	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	9	0,017	nie	
IL-1β [pg/ml]	dziewczynki	11	0,003	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	9	0,458	tak	
TRAIL [pg/ml]	dziewczynki	11	0,026	nie	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	9	0,212	tak	
OPG [pmol/l]	dziewczynki	11	0,975	tak	Mann-Whitney (MW)
	chłopcy	9	0,030	nie	
sRANKL [pmol/l]	dziewczynki	11	0,241	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	9	0,101	tak	
sFasL [ng/ml]	dziewczynki	7	0,363	tak	t-Student'a (t-test)
	chłopcy	8	0,142	tak	

Struktura płci w badanych grupach dzieci

Strukturę płci oraz licznosci badanych grup przedstawiono w Tabeli 8 i na wykresie słupkowym (Wykres 1).

Tabela 8. Struktura płci badanych grup (Chi-kwadrat $p=0,16$)

			Płeć		Ogółem
			dziewczynki	chłopcy	
Grupa	hiperT	Liczebność	16	6	22
		% z Grupa	72,7%	27,3%	100,0%
		% z Płeć	35,6%	31,6%	34,4%
		% z Ogółem	25,0%	9,4%	34,4%
	hipoT	Liczebność	18	4	22
		% z Grupa	81,8%	18,2%	100,0%
		% z Płeć	40,0%	21,1%	34,4%
		% z Ogółem	28,1%	6,3%	34,4%
	kontrola	Liczebność	11	9	20
		% z Grupa	55,0%	45,0%	100,0%
		% z Płeć	24,4%	47,4%	31,3%
		% z Ogółem	17,2%	14,1%	31,3%
Ogółem	Liczebność	45	19	64	
	% z Grupa	70,3%	29,7%	100,0%	
	% z Płeć	100,0%	100,0%	100,0%	
	% z Ogółem	70,3%	29,7%	100,0%	



Wykres 1. Struktura płci badanych grup – wykres słupkowy

Pomimo większego odsetka dziewczynek w badanych grupach nie stwierdzono istotnego związku między badaną grupą, a strukturą płci – można stwierdzić, że badane grupy posiadają porównywalną strukturę (Chi-kwadrat $p=0,16$). Jest to korzystne z punktu widzenia analizy statystycznej.

Zestawienie wyników badanych parametrów i wykonanych oznaczeń w grupach dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy oraz w grupie kontrolnej

Statystyki opisowe badanych grup pacjentów przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Zestawienie wyników badanych grup dzieci

	Grupa	n	Średnia	SD	Mediana	IQR	Minimum	Maksimum
Wiek [lata]	hiperT	22	12,68	4,62	14,75	7,09	3,17	18,11
	hipoT	22	11,39	2,68	11,30	3,80	6,68	15,99
	kontrola	20	11,57	4,86	12,72	8,63	1,99	18,00
BMI [kg/m ²]	hiperT	22	18,25	3,42	18,21	5,49	13,43	25,25
	hipoT	22	19,18	4,54	18,69	5,45	13,43	33,69
	kontrola	20	18,17	3,50	17,29	6,98	13,40	24,61
BMI SDS	hiperT	22	-0,38	1,05	-0,28	1,26	-2,17	1,97
	hipoT	22	0,33	1,54	0,30	2,04	-1,74	4,96
	kontrola	20	-0,17	1,04	-0,55	1,29	-1,61	1,91
wskaźnik Cole'a [bezwgl.]	hiperT	22	0,95	0,13	0,96	0,17	0,71	1,24
	hipoT	22	1,05	0,22	1,05	0,28	0,77	1,62
	kontrola	20	0,97	0,14	0,92	0,15	0,78	1,29
TSH [μIU/ml]	hiperT	22	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,03
	hipoT	22	46,76	47,59	37,34	17,69	5,35	220,00
	kontrola	20	2,28	0,99	2,42	1,52	1,20	4,67
fT4 [ng/dl]	hiperT	22	4,24	1,06	4,22	1,72	2,26	6,00
	hipoT	22	0,54	0,31	0,61	0,52	0,00	1,09
	kontrola	20	1,03	0,12	1,05	0,17	0,86	1,26
fT3 [pg/ml]	hiperT	22	19,01	5,30	20,21	6,07	5,92	26,50
	hipoT	22	2,10	0,97	2,28	1,27	0,01	3,99
	kontrola	20	2,70	0,56	2,72	0,63	1,11	3,47
TRAb [IU/l]	hiperT	22	24,05	20,76	16,75	24,60	4,20	87,30
	hipoT	16	0,69	0,35	0,65	0,60	0,30	1,50
	kontrola	7	0,51	0,31	0,50	0,50	0,00	0,90
ATG [IU/ml]	hiperT	22	426,51	649,85	101,50	552,48	9,00	2141,00
	hipoT	20	533,75	770,25	124,00	589,45	33,70	2000,00
	kontrola	20	18,90	9,41	20,00	4,50	0,00	36,00
ATPO [IU/ml]	hiperT	22	2280,18	1080,42	3000,00	1536,75	15,00	3000,00
	hipoT	22	2597,41	912,93	3000,00	111,50	163,00	3000,00
	kontrola	20	13,80	12,52	10,00	29,25	0,00	30,00
IL-6 [pg/ml]	hiperT	22	1,96	1,79	1,60	0,04	0,39	9,18
	hipoT	22	2,09	2,13	1,60	0,07	0,39	11,10
	kontrola	20	1,40	0,53	1,56	0,37	0,12	2,48

	Grupa	n	Średnia	SD	Mediana	IQR	Minimum	Maksimum
TNF-α [pg/ml]	hiperT	22	10,44	8,31	13,63	15,28	0,00	28,51
	hipoT	22	19,57	31,95	15,08	21,94	0,00	143,44
	kontrola	20	6,43	7,26	0,96	12,81	0,00	17,75
IL-1β [pg/ml]	hiperT	22	1,45	0,67	1,39	1,27	0,26	2,68
	hipoT	22	2,58	1,80	2,16	0,87	0,11	9,53
	kontrola	20	1,48	0,70	1,88	1,04	0,01	2,38
TRAIL [pg/ml]	hiperT	22	97,15	39,05	88,06	51,81	52,31	215,34
	hipoT	22	69,08	46,61	62,43	42,31	5,90	208,85
	kontrola	20	68,55	53,28	60,66	44,63	1,04	194,59
OPG [pmol/l]	hiperT	22	4,48	2,01	4,68	2,86	1,17	8,30
	hipoT	22	3,79	1,28	3,77	1,79	1,60	6,37
	kontrola	20	3,02	1,17	3,00	1,98	1,46	5,51
sRANKL [pmol/l]	hiperT	22	0,39	0,58	0,20	0,33	0,00	2,10
	hipoT	22	0,38	0,45	0,23	0,35	0,00	2,10
	kontrola	20	0,27	0,34	0,09	0,48	0,00	1,21
sFasL [ng/ml]	hiperT	19	0,14	0,07	0,14	0,09	0,00	0,25
	hipoT	11	0,27	0,11	0,26	0,14	0,11	0,50
	kontrola	15	0,09	0,10	0,06	0,15	0,00	0,34

Statystyki opisowe wykonanych badań w grupie dzieci z **nadczynnością** tarczycy podzielonej na podgrupy ze względu na płeć przedstawiono w poniższej Tabeli 10:

Tabela 10. Zestawienie wyników grupy dzieci z nadczynnością tarczycy, podział pod względem płci

	Płeć	n	Średnia	SD	Mediana	IQR	Min.	Maks.
Wiek [lata]	dziewczynki	16	11,95	4,87	13,94	8,48	3,17	17,66
	chłopcy	6	14,62	3,50	16,01	5,86	8,79	18,11
BMI [kg/m²]	dziewczynki	16	18,41	3,77	17,30	6,64	13,43	25,25
	chłopcy	6	17,81	2,45	18,57	3,80	13,60	20,38
BMI SDS	dziewczynki	16	-0,19	1,13	-0,11	1,61	-2,17	1,97
	chłopcy	6	-0,88	0,59	-0,85	1,18	-1,72	-0,24
wsk. Cole'a [bezwgl.]	dziewczynki	16	0,98	0,14	0,99	0,22	0,75	1,24
	chłopcy	6	0,88	0,10	0,90	0,16	0,71	0,97
TSH [μIU/ml]	dziewczynki	16	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,03
	chłopcy	6	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01
fT4 [ng/dl]	dziewczynki	16	4,09	0,98	4,03	1,77	2,26	5,51
	chłopcy	6	4,63	1,23	4,52	2,35	2,83	6,00
fT3 [pg/ml]	dziewczynki	16	17,91	5,51	19,10	7,93	5,92	26,50
	chłopcy	6	21,95	3,58	20,63	6,86	17,68	26,42
TRAb [IU/l]	dziewczynki	16	24,64	22,65	16,75	22,00	4,20	87,30
	chłopcy	6	22,48	16,35	20,70	33,68	5,70	41,70
ATG [IU/ml]	dziewczynki	16	415,77	600,76	112,00	747,65	9,00	2000,00
	chłopcy	6	455,17	830,43	101,50	690,50	45,00	2141,00
ATPO [IU/ml]	dziewczynki	16	2395,63	1122,21	3000,00	1094,25	15,00	3000,00
	chłopcy	6	1972,33	983,98	2037,50	1945,25	529,00	3000,00
IL-6 [pg/ml]	dziewczynki	16	1,75	0,83	1,60	0,04	1,10	4,85
	chłopcy	6	2,53	3,30	1,60	2,79	0,39	9,18
TNF-α [pg/ml]	dziewczynki	16	10,68	8,88	13,63	15,39	0,00	28,51
	chłopcy	6	9,81	7,27	10,14	12,58	0,00	18,23
IL-1β [pg/ml]	dziewczynki	16	1,45	0,71	1,34	1,29	0,26	2,68
	chłopcy	6	1,45	0,61	1,59	1,02	0,69	2,38
TRAIL [pg/ml]	dziewczynki	16	90,66	30,18	85,89	47,45	52,31	150,74
	chłopcy	6	114,46	56,39	102,43	85,35	61,66	215,34
OPG [pmol/l]	dziewczynki	16	4,48	2,03	4,68	2,70	1,17	8,30
	chłopcy	6	4,48	2,17	4,21	3,59	2,14	7,78
sRANKL [pmol/l]	dziewczynki	16	0,49	0,66	0,32	0,47	0,00	2,10
	chłopcy	6	0,13	0,13	0,10	0,21	0,01	0,36
sFasL [ng/ml]	dziewczynki	15	0,14	0,08	0,14	0,09	0,00	0,24
	chłopcy	4	0,14	0,08	0,12	0,14	0,06	0,25

Statystyki opisowe wykonanych badań w grupie dzieci z **niedoczynnością** tarczycy podzielonej na podgrupy ze względu na płeć przedstawiono w poniższej w Tabeli 11.

Tabela 11. Zestawienie wyników – grupa dzieci z niedoczynnością tarczycy, podział pod względem płci

	Płeć	n	Średnia	SD	Mediana	IQR	Min.	Maks.
Wiek [lata]	dziewczynki	18	11,88	2,62	11,69	3,99	6,72	15,99
	chłopcy	4	9,18	1,88	9,42	3,53	6,68	11,20
BMI [kg/m²]	dziewczynki	18	19,21	4,66	19,44	5,45	13,43	33,69
	chłopcy	4	19,01	4,61	18,34	8,49	14,12	25,24
BMI SDS	dziewczynki	18	0,27	1,54	0,32	2,06	-1,74	4,96
	chłopcy	4	0,58	1,72	0,19	3,12	-1,06	3,00
wsk. Cole'a [bezwgl.]	dziewczynki	18	1,03	0,21	1,05	0,29	0,77	1,62
	chłopcy	4	1,11	0,25	1,03	0,45	0,90	1,48
TSH [μIU/ml]	dziewczynki	18	41,96	49,26	31,29	23,66	5,35	220,00
	chłopcy	4	68,36	36,63	70,00	64,92	33,44	100,00
fT4 [ng/dl]	dziewczynki	18	0,55	0,33	0,61	0,55	0,00	1,09
	chłopcy	4	0,51	0,26	0,53	0,50	0,19	0,79
fT3 [pg/ml]	dziewczynki	18	2,07	0,98	2,25	1,27	0,01	3,99
	chłopcy	4	2,21	1,06	2,31	1,96	0,81	3,40
TRAb [IU/l]	dziewczynki	14	0,74	0,34	0,80	0,45	0,30	1,50
	chłopcy	2	0,30	-	0,30	-	0,30	0,30
ATG [IU/ml]	dziewczynki	16	505,74	762,37	107,50	590,95	33,70	2000,00
	chłopcy	4	645,75	911,34	262,00	1504,25	59,00	2000,00
ATPO [IU/ml]	dziewczynki	18	2628,78	902,84	3000,00	111,50	163,00	3000,00
	chłopcy	4	2456,25	1087,50	3000,00	1631,25	825,00	3000,00
IL-6 [pg/ml]	dziewczynki	18	2,23	2,34	1,60	0,19	0,39	11,10
	chłopcy	4	1,50	0,31	1,60	0,52	1,05	1,74
TNF-α [pg/ml]	dziewczynki	18	22,06	34,78	15,08	22,55	0,00	143,44
	chłopcy	4	8,38	9,44	8,49	16,45	0,00	16,56
IL-1β [pg/ml]	dziewczynki	18	2,73	1,89	2,16	0,91	1,23	9,53
	chłopcy	4	1,90	1,25	2,31	2,23	0,11	2,87
TRAIL [pg/ml]	dziewczynki	18	69,94	50,94	56,80	50,43	5,90	208,85
	chłopcy	4	65,21	21,89	74,06	36,89	32,90	79,84
OPG [pmol/l]	dziewczynki	18	3,74	1,25	3,64	1,76	1,60	6,37
	chłopcy	4	3,98	1,60	4,20	3,00	1,84	5,69
sRANKL [pmol/l]	dziewczynki	18	0,42	0,48	0,36	0,37	0,00	2,10
	chłopcy	4	0,16	0,07	0,15	0,13	0,09	0,24
sFasL [ng/ml]	dziewczynki	10	0,27	0,12	0,26	0,17	0,11	0,50
	chłopcy	1	0,27	-	0,27	-	0,27	0,27

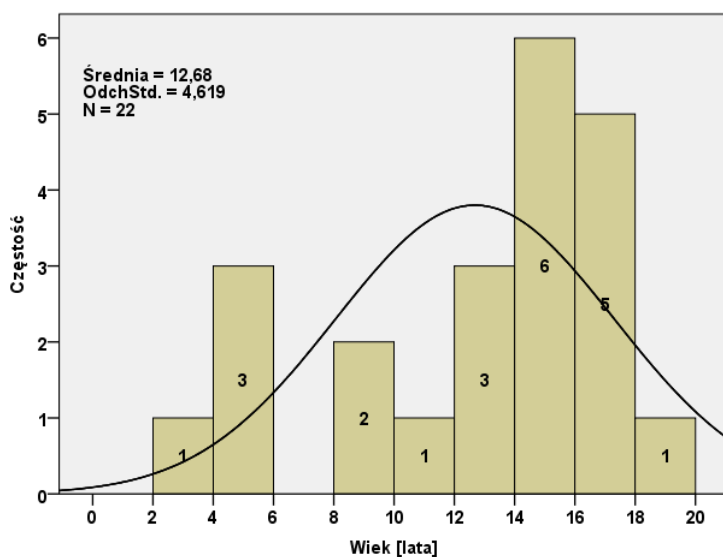
Statystyki opisowe wykonanych badań w grupie **kontrolnej** podzielonej na podgrupy ze względu na płeć przedstawiono poniżej w Tabeli 12.

Tabela 12. Zestawienie wyników – grupa kontrolna, podział pod względem płci

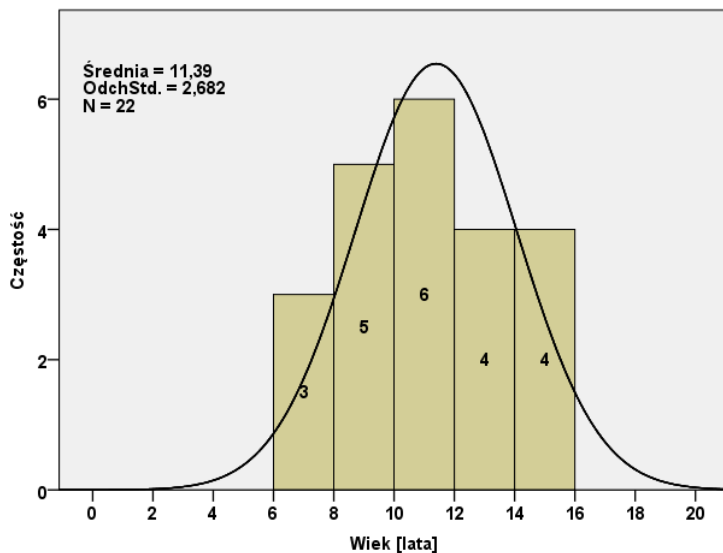
	Płeć	n	Średnia	SD	Mediana	IQR	Min.	Maks.
Wiek [lata]	dziewczynki	11	13,10	4,14	14,70	7,31	6,41	18,00
	chłopcy	9	9,70	5,25	9,12	9,72	1,99	17,13
BMI [kg/m²]	dziewczynki	11	18,86	3,77	17,93	8,12	14,49	24,61
	chłopcy	9	17,34	3,15	16,42	5,54	13,40	22,31
BMI SDS	dziewczynki	11	-0,10	1,13	-0,58	1,66	-1,61	1,84
	chłopcy	9	-0,26	0,99	-0,52	1,27	-1,36	1,91
wsk. Cole'a [bezwgl.]	dziewczynki	11	0,98	0,16	0,92	0,22	0,78	1,29
	chłopcy	9	0,96	0,12	0,92	0,15	0,78	1,19
TSH [μIU/ml]	dziewczynki	11	1,97	0,90	1,48	1,65	1,20	3,69
	chłopcy	9	2,67	1,00	2,49	1,28	1,37	4,67
fT4 [ng/dl]	dziewczynki	11	1,01	0,13	1,01	0,21	0,86	1,26
	chłopcy	9	1,06	0,10	1,06	0,16	0,90	1,23
fT3 [pg/ml]	dziewczynki	11	2,63	0,40	2,56	0,44	1,88	3,46
	chłopcy	9	2,78	0,72	2,92	0,82	1,11	3,47
TRAb [IU/l]	dziewczynki	4	0,43	0,33	0,45	0,63	0,00	0,80
	chłopcy	3	0,63	0,31	0,70	-	0,30	0,90
ATG [IU/ml]	dziewczynki	11	18,45	12,33	20,00	23,00	0,00	36,00
	chłopcy	9	19,44	4,45	20,00	3,50	9,00	25,00
ATPO [IU/ml]	dziewczynki	11	10,91	10,81	8,00	15,00	0,00	30,00
	chłopcy	9	17,33	14,17	25,00	30,00	0,00	30,00
IL-6 [pg/ml]	dziewczynki	11	1,45	0,58	1,60	0,99	0,48	2,48
	chłopcy	9	1,34	0,48	1,56	0,36	0,12	1,60
TNF-α [pg/ml]	dziewczynki	11	5,61	7,51	0,38	14,59	0,00	16,71
	chłopcy	9	7,42	7,27	11,04	12,81	0,00	17,75
IL-1β [pg/ml]	dziewczynki	11	1,52	0,71	1,88	0,72	0,01	2,06
	chłopcy	9	1,44	0,73	1,77	1,15	0,18	2,38
TRAIL [pg/ml]	dziewczynki	11	62,95	51,40	67,74	49,82	1,04	194,14
	chłopcy	9	75,40	57,81	46,34	79,52	9,35	194,59
OPG [pmol/l]	dziewczynki	11	3,31	0,96	3,31	1,20	1,65	4,81
	chłopcy	9	2,66	1,36	1,89	1,96	1,46	5,51
sRANKL [pmol/l]	dziewczynki	11	0,43	0,40	0,41	0,60	0,00	1,21
	chłopcy	9	0,08	0,08	0,05	0,13	0,00	0,24
sFasL [ng/ml]	dziewczynki	7	0,12	0,12	0,08	0,18	0,00	0,34
	chłopcy	8	0,07	0,07	0,06	0,10	0,00	0,21

Histogramy rozkładu częstości badanych parametrów i wykonanych oznaczeń w grupach dzieci - wykresy

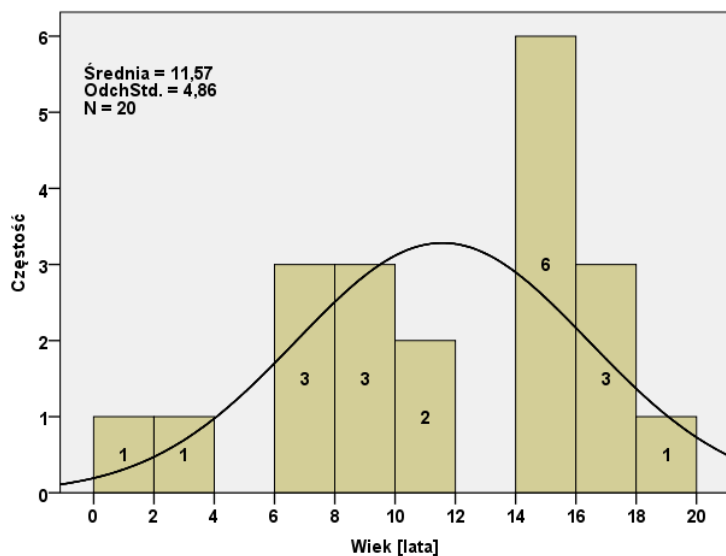
Rozkłady badanych parametrów i wykonanych oznaczeń przedstawiono na poniższych histogramach. Zastosowano identyczne skale pomiarowe i zakresy dla każdego oznaczenia w trzech grupach (hiperT, hipoT, kontrolna) celem łatwego porównania rozkładów zmiennej. Relację obserwowanych wartości do zakresów prawidłowych zawarto w komentarzach. Histogramy przedstawiają również krzywą rozkładu badanych zmiennych.



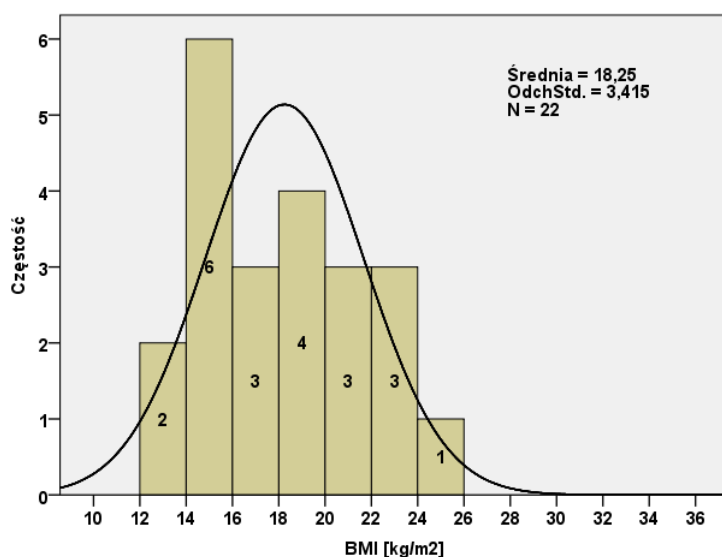
Wykres 2. Histogram wieku w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy. Brak zgodności z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,011$).



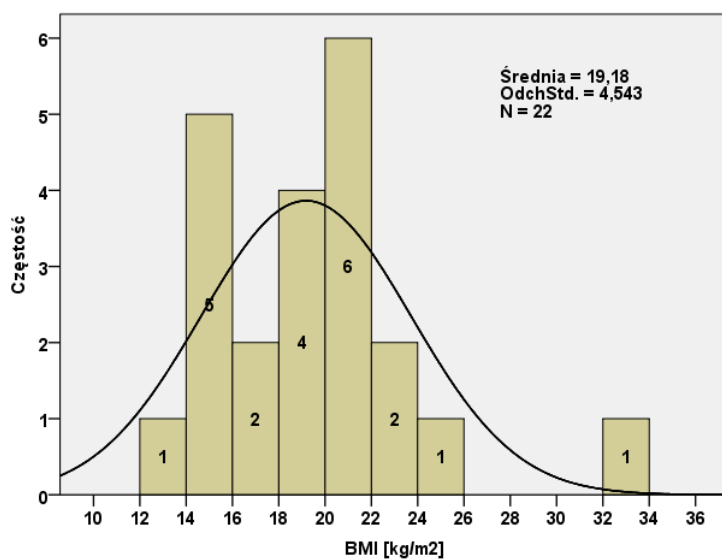
Wykres 3. Histogram wieku w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy. Rozkład zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,755$).



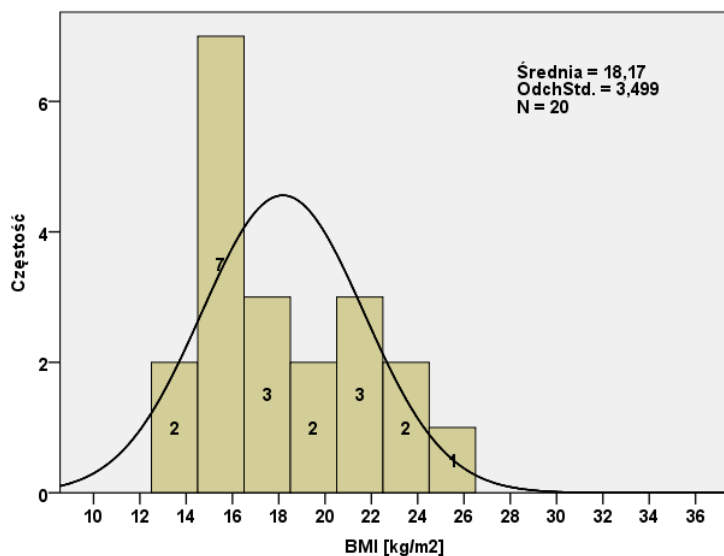
Wykres 4. Histogram wieku w grupie kontrolnej. Rozkład zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,126$).



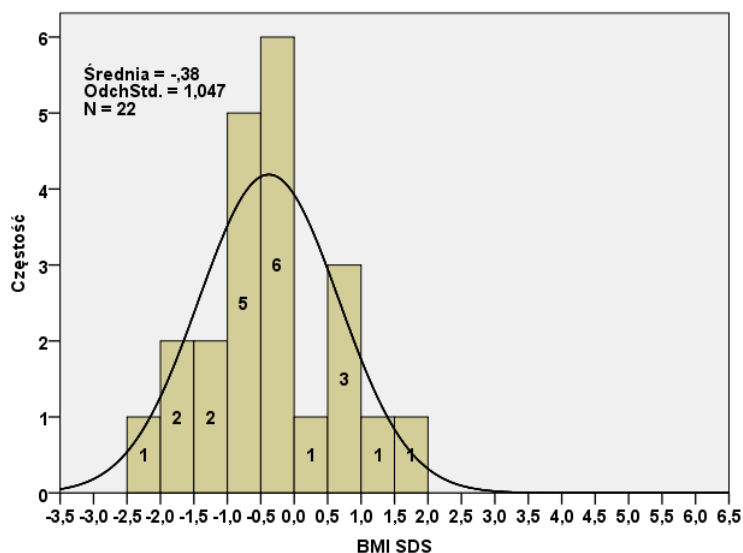
Wykres 5. Histogram BMI w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy. Rozkład zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,33$).



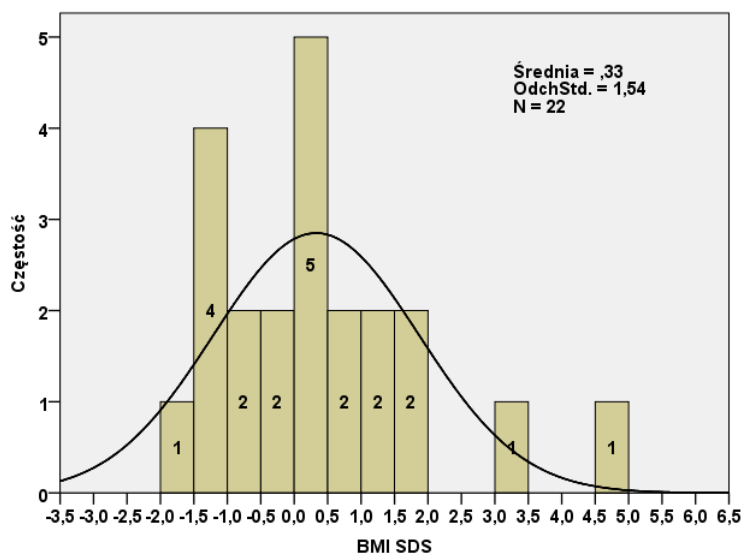
Wykres 6. Histogram BMI w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy. Brak zgodności z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,012$).



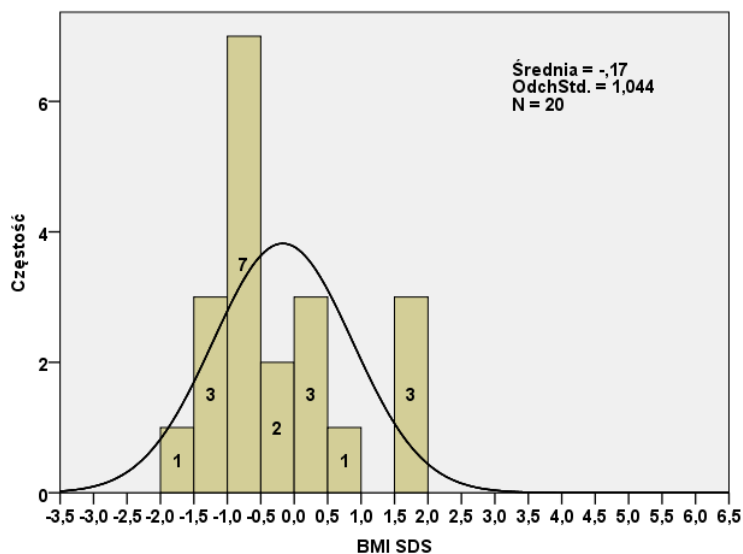
Wykres 7. Histogram BMI w grupie kontrolnej. Rozkład zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,084$).



Wykres 8. Histogram BMI-SDS w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy. U $n=1$ pacjentki (4,5%) stwierdzono niedobór masy ciała tj. BMI poniżej dwóch odchyłeń standardowych od średniej dla wieku (BMI-SDS= -2,17). Przeważająca część pacjentów miała BMI-SDS poniżej wartości średniej dla wieku ($n=17$). Rozkład zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,889$).



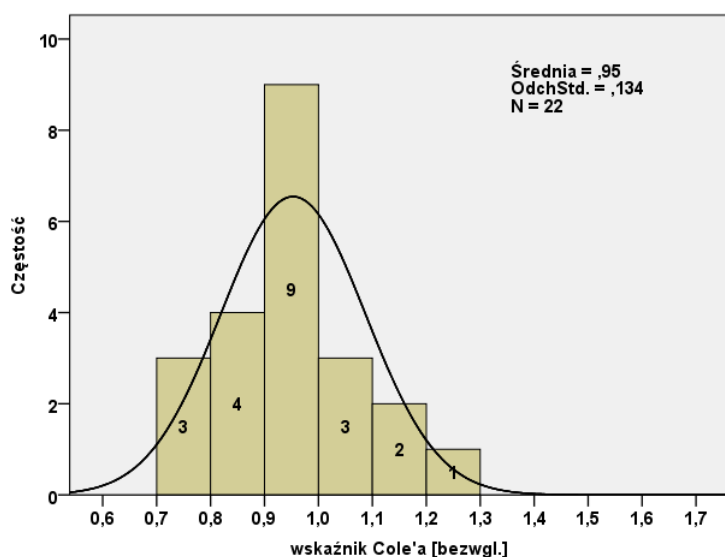
Wykres 9. Histogram BMI-SDS w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy. U dwójga pacjentów - jednej dziewczynki i jednego chłopca - stwierdzono otyłość, tj. BMI-SDS > 2 (3; 4,96). Przeważająca część pacjentów miała BMI-SDS powyżej wartości średniej dla wieku ($n=13$). Brak zgodności z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,019$).



Wykres 10. Histogram BMI-SDS

w grupie kontrolnej.

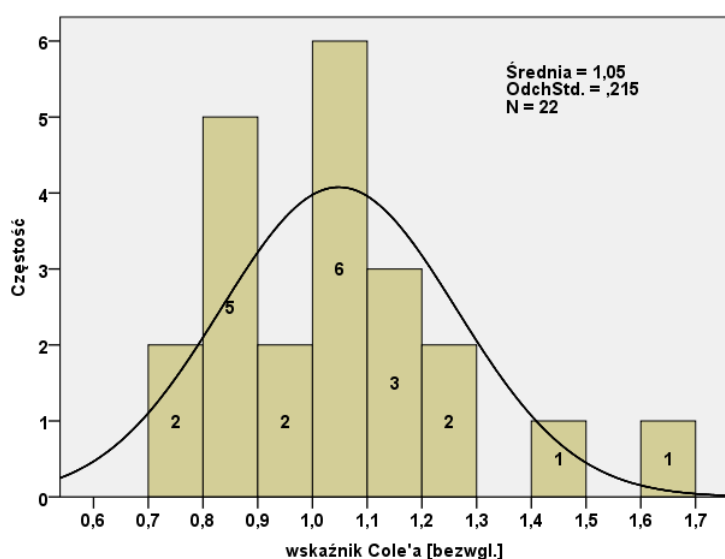
U wszystkich pacjentów stwierdzono prawidłową masę ciała przyjmując kryterium BMI-SDS, które mieściło się w zakresie (-2; 2). Brak zgodności z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,037$).



Wykres 11. Histogram wskaźnika

Cole'a w grupie dzieci

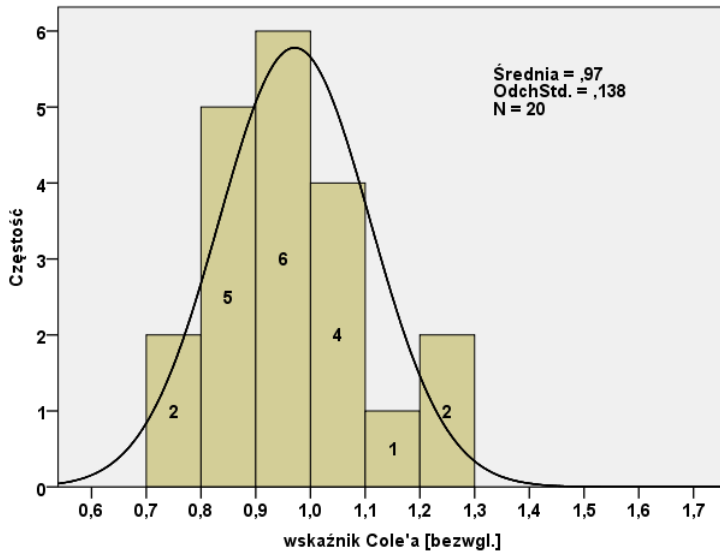
z nadczynnością tarczycy. Według kryterium wskaźnika Cole'a u n=2 (9%) dzieci można rozpoznać wyniszczenie (<0,75), u n=5 dzieci (23%) niedowagę (0,75-0,89); u n=12 (54,5%) prawidłową masę ciała (0,9-1,09); u n=2 (9%) nadwagę (1,1-1,19) i u 1 pacjenta (4,5%) otyłość (>1,2). Rozkład zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,94$).



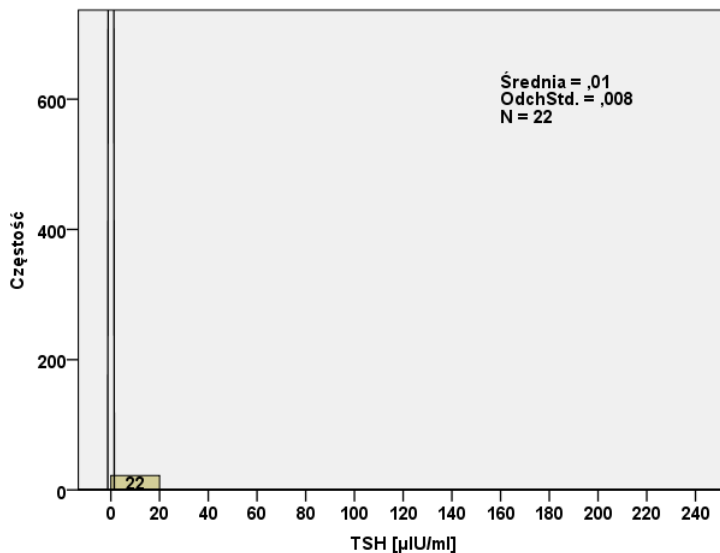
Wykres 12. Histogram wskaźnika

Cole'a w grupie dzieci

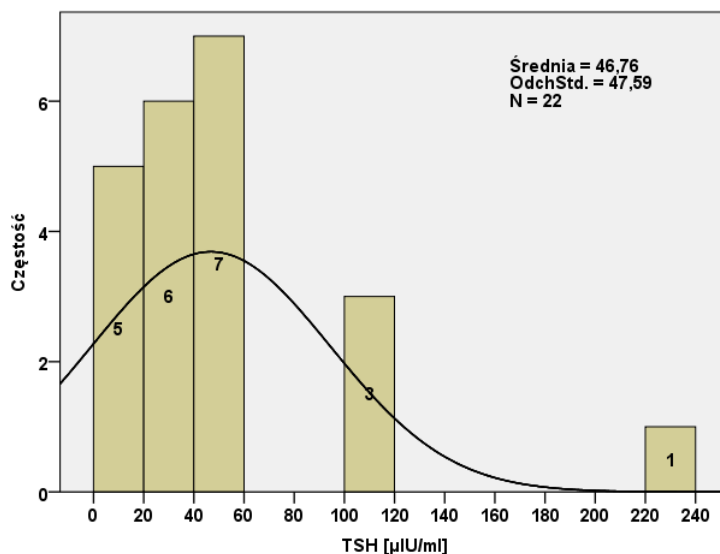
z niedoczynnością tarczycy. Według kryterium wskaźnika Cole'a u n=7 dzieci (32%) można rozpoznać niedowagę (0,75-0,89); u n=8 (36%) prawidłową masę ciała (0,9-1,09); u n=3 (14%) nadwagę (1,1-1,19) i u n=4 pacjentów (18%) otyłość (>1,2). Rozkład granicznie zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,061$).



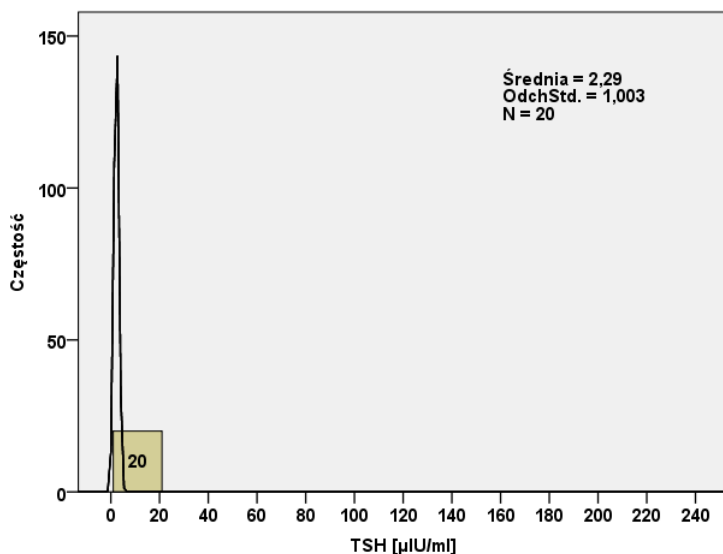
Wykres 13. Histogram wskaźnika Cole'a w grupie kontrolnej. Według kryterium wskaźnika Cole'a u n=7 dzieci (35%) można rozpoznać niedowagę (0,75-0,89); u n=10 (50%) prawidłową masę ciała (0,9-1,09); u n=1 (5%) nadwagę (1,1-1,19) i u n=2 dzieci (10%) otyłość (>1,2). Rozkład zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk p=0,1).



Wykres 14. Histogram stężenia TSH w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy. U wszystkich pacjentów(100%) stwierdzono ekstremalną supresję TSH – stężenie bliskie 0 µIU/ml. Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk p<0,001).

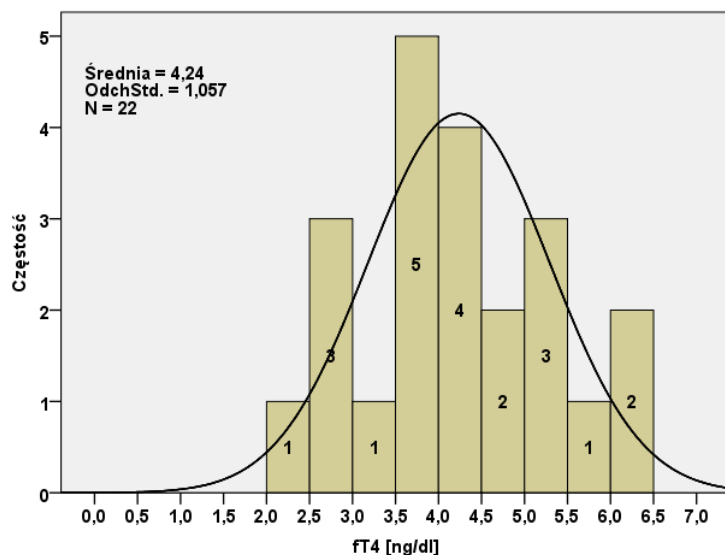


Wykres 15. Histogram stężenia TSH w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy. U wszystkich pacjentów (100%) stwierdzono stężenia powyżej górnej granicy normy tj. 4,67 µIU/ml, w tym wartości ekstremalnie wysokie. Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk p<0,001).



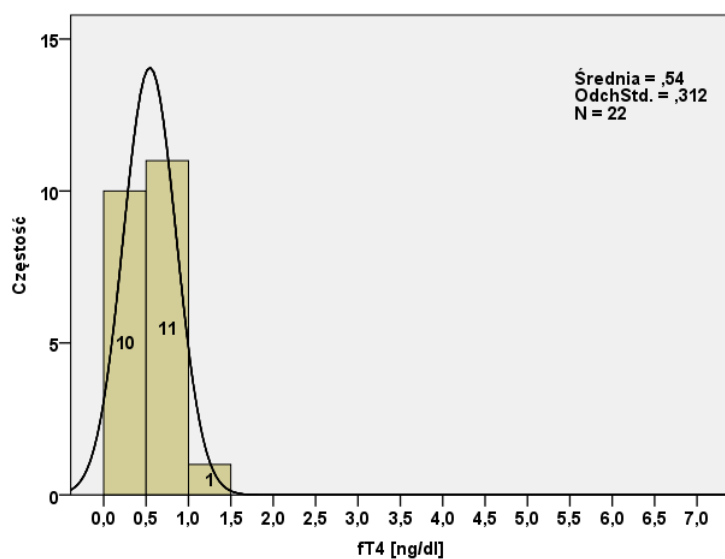
Wykres 16. Histogram stężenia

TSH w grupie kontrolnej.
U wszystkich pacjentów (100%)
stwierdzono prawidłowe
stężenia TSH w zakresie 0,49-
4,67 µIU/ml.
Brak zgodności rozkładu
z rozkładem normalnym
(Shapiro-Wilk p=0,023).



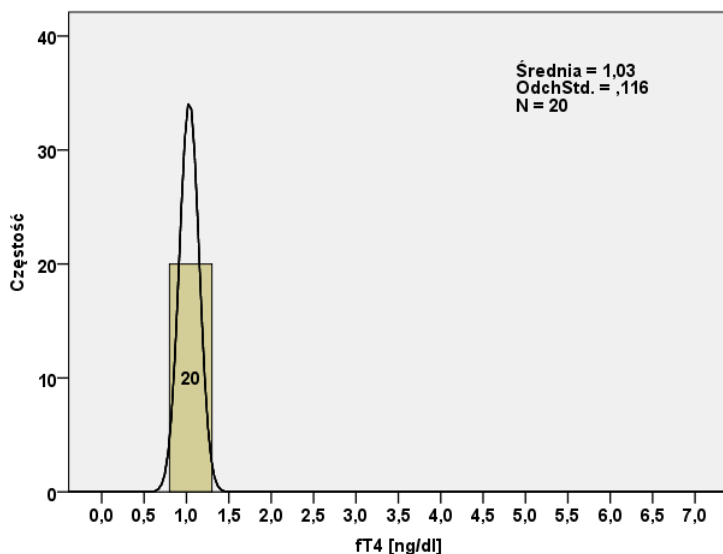
Wykres 17. Histogram stężenia fT4

w grupie dzieci
z nadczynnością tarczycy.
U wszystkich pacjentów (100%)
stwierdzono podwyższone stężenia
fT4, powyżej górnej granicy normy
wynoszącej 1,85 ng/dl. Rozkład
zgodny
z rozkładem normalnym (Shapiro-
Wilk p=0,817).



Wykres 18. Histogram stężenia

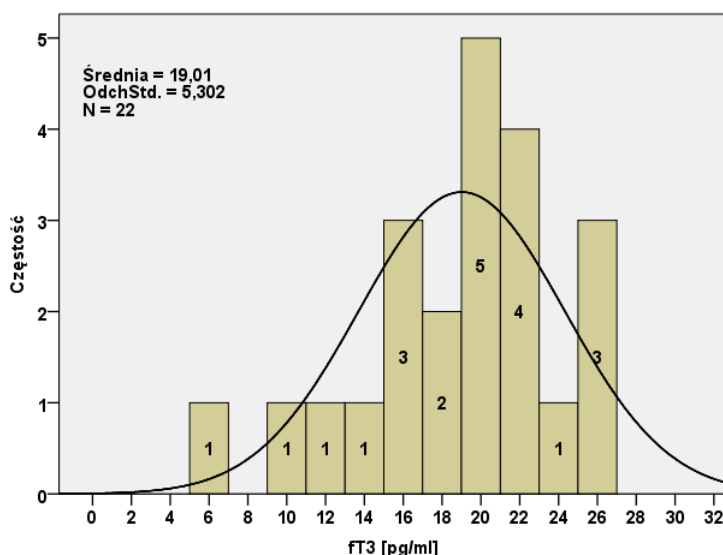
fT4 w grupie dzieci
z niedoczynnością tarczycy.
U n=16 (64%) pacjentów
stwierdzono obniżone stężenia fT4
(<0,71 ng/dl), u pozostałych n=8
(36%) stężenia były w dolnej
granicy normy (0,71 ng/ml).
Rozkład zgodny
z rozkładem normalnym (Shapiro-
Wilk p=0,387).



Wykres 19. Histogram stężenia fT4 w grupie kontrolnej.

U wszystkich dzieci stężenia fT4 były prawidłowe (0,71-1,85 ng/dl).

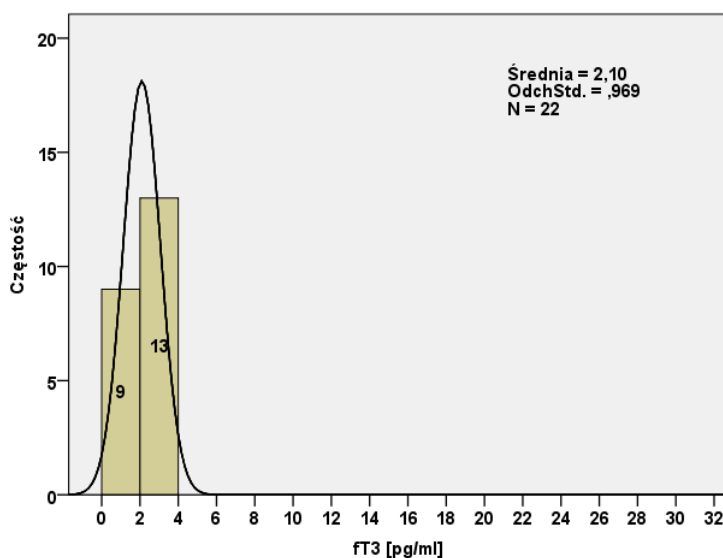
Rozkład zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk p=0,599).



Wykres 20. Histogram stężenia fT3 w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.

U wszystkich pacjentów stwierdzono stężenia znacznie powyżej górnej granicy normy wynoszącej 3,48 pg/ml, obserwowano również liczne wyniki ekstremalnie wysokie.

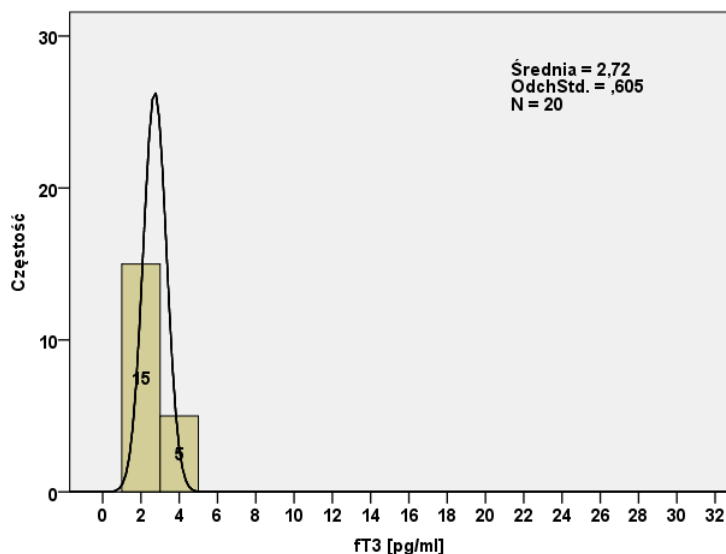
Rozkład zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk p=0,304).



Wykres 21. Histogram stężenia fT3 w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.

U n=5 (23%) dzieci stwierdzono stężenia obniżone (<1,45 pg/ml), a u pozostałych n=17 (77%) prawidłowe (1,45 - 3,48 pg/ml).

Rozkład zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk p=0,961).

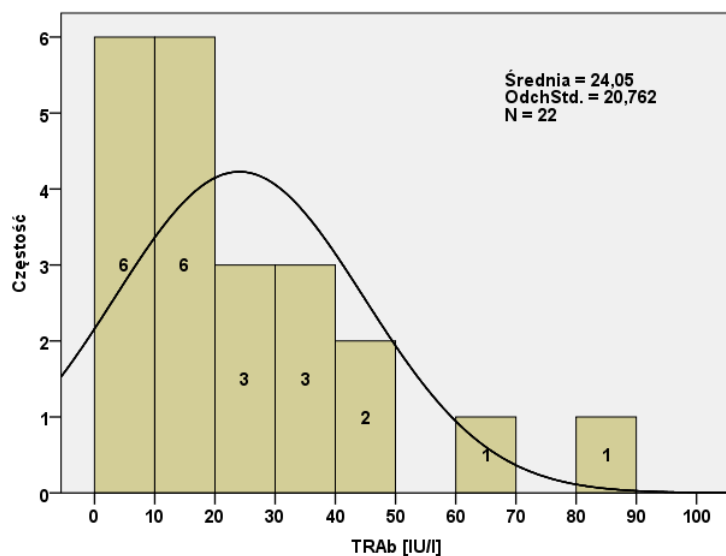


Wykres 22. Histogram stężenia

fT3 w grupie kontrolnej.

U wszystkich dzieci stwierdzono prawidłowe stężenia fT3 (1,45 - 3,48 pg/ml).

Rozkład zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,434$).



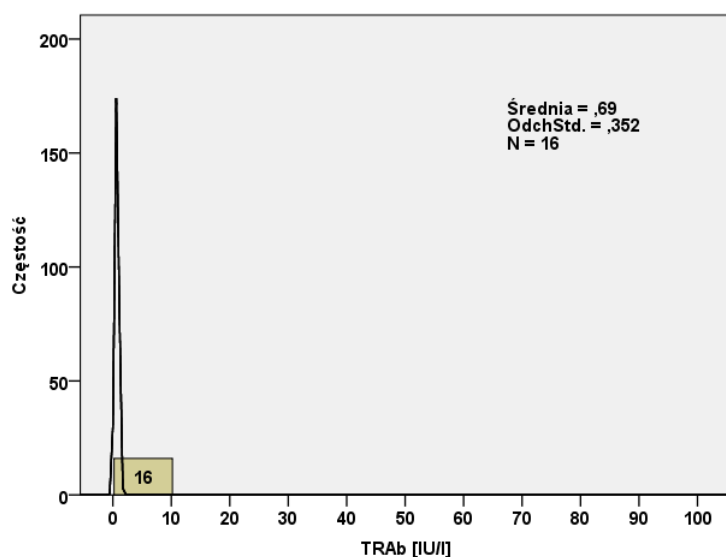
Wykres 23. Histogram stężenia

TRAb w grupie dzieci

z nadczynnością tarczycy.

U wszystkich pacjentów stwierdzono dodatnie (>1,5 U/l) stężenia TRAb, w tym stężenia ekstremalnie wysokie.

Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,002$).

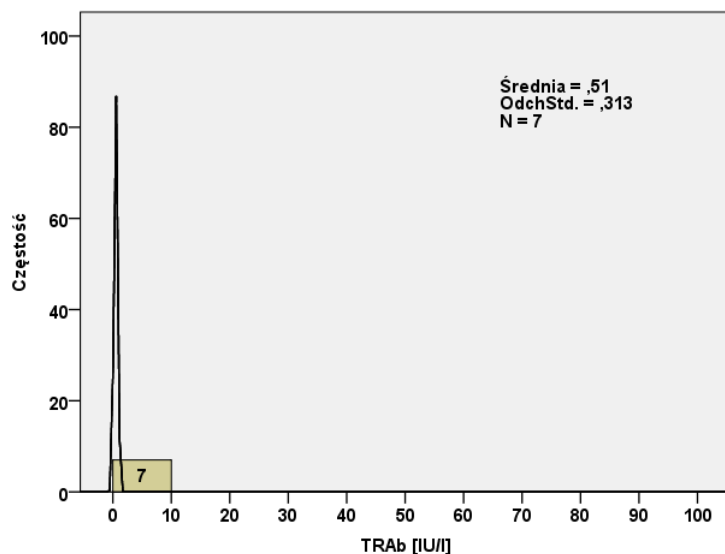


Wykres 24. Histogram stężenia

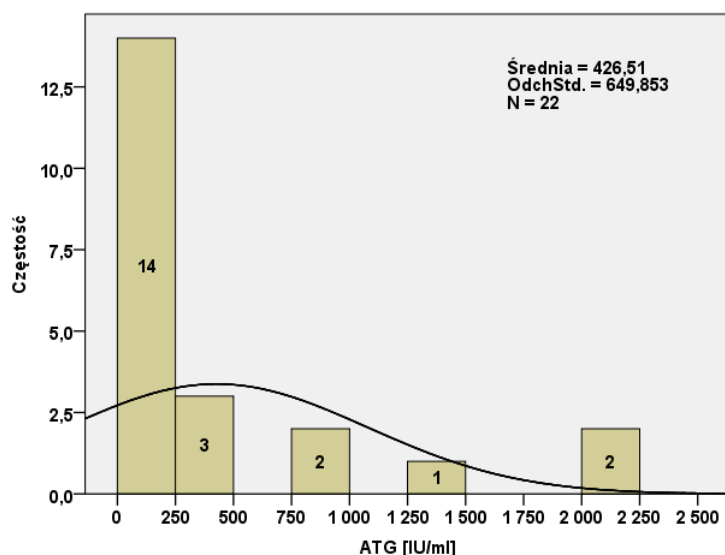
TRAb w grupie dzieci

z niedoczynnością tarczycy,

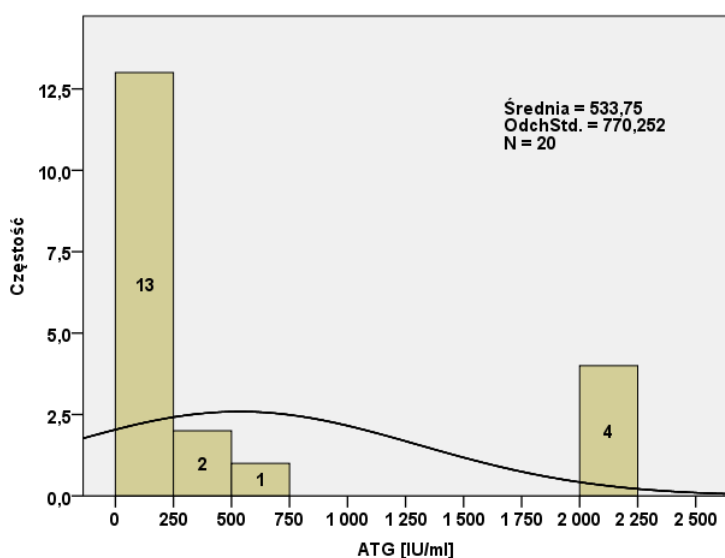
oznaczenia wykonano u $n=16$ dzieci. U $n=2$ (12,5%) stężenia TRAb były wątpliwe (1-1,5 U/l), u pozostałych $n=14$ ujemne (<1 U/l; 87,5%). Rozkład granicznie zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,052$).



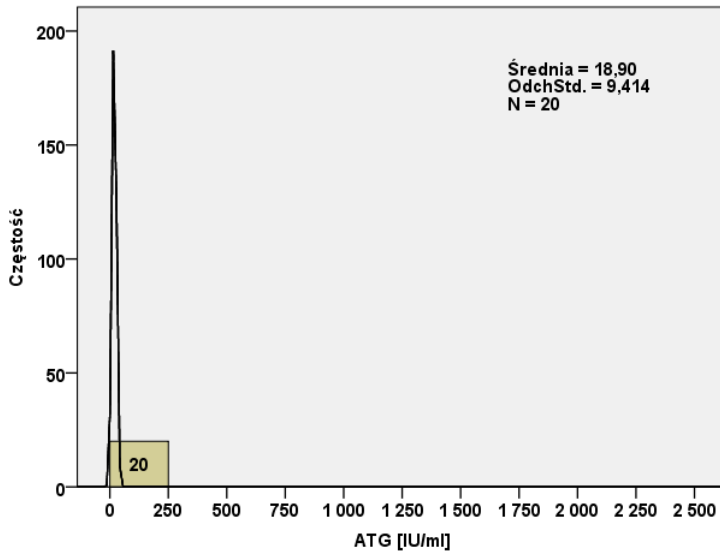
Wykres 25. Histogram stężenia TRAb w grupie kontrolnej, oznaczenia wykonano u n=7 dzieci, u wszystkich uzyskano wyniki ujemne (<1 U/l). Rozkład zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk p=0,88).



Wykres 26. Histogram stężenia ATG w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy. U wszystkich pacjentów stwierdzono podwyższone stężenia ATG (>60 IU/ml), w tym wartości ekstremalnie wysokie. Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk p<0,001).



Wykres 27. Histogram stężenia ATG w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy (oznaczono u n=20 dzieci). U n=5 (25%) stwierdzono wartości (<60 IU/ml), u pozostałych (n=15; 75%) – wartości (>60 IU/ml), w tym ekstremalnie wysokie. Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk p<0,001).

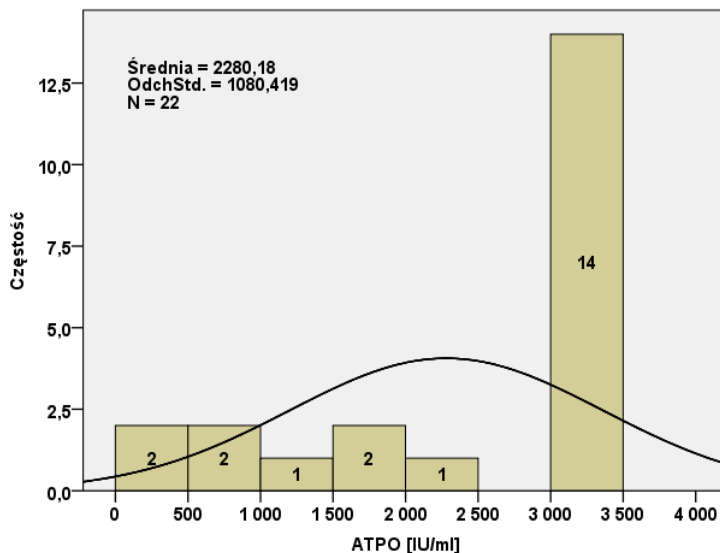


Wykres 28. Histogram stężenia

ATG w grupie kontrolnej.

U wszystkich dzieci stwierdzono wartości prawidłowe (<60 IU/ml).

Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,027$).

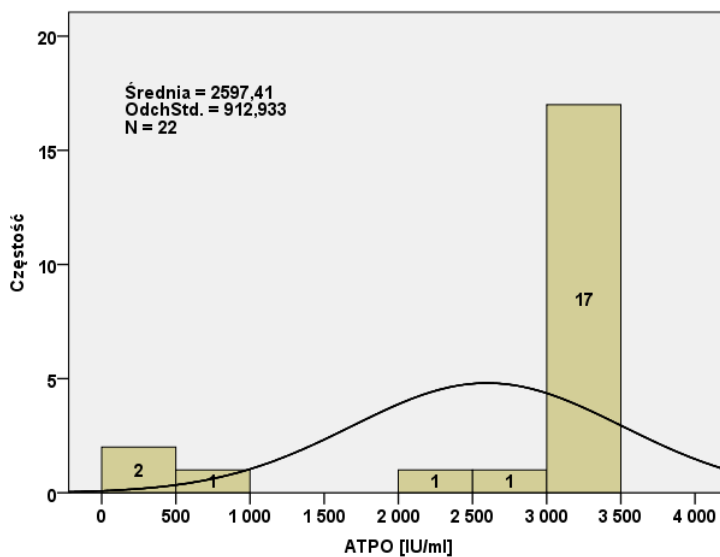


Wykres 29. Histogram stężenia

ATPO w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.

U $n=21$ (95,5%) stwierdzono podwyższone stężenie (>60 IU/ml), natomiast u 1 dziecka (4,5%) - (<60 IU/ml).

Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p<0,001$).

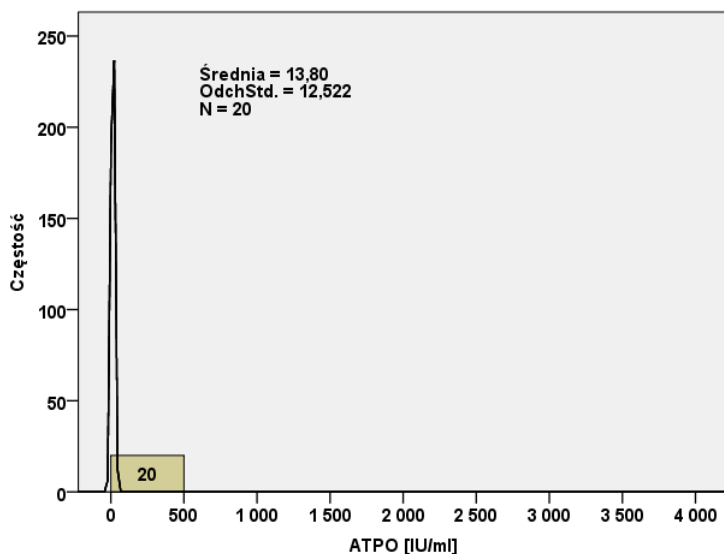


Wykres 30. Histogram stężenia

ATPO w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.

U wszystkich dzieci stwierdzono podwyższone stężenie (>60 IU/ml), w tym przeważające wartości ekstremalnie wysokie.

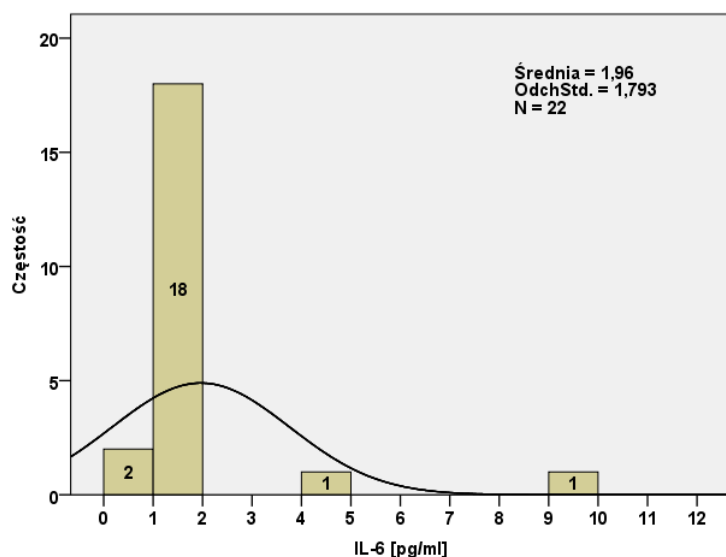
Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p<0,001$).



Wykres 31. Histogram stężenia

ATPO w grupie kontrolnej.

U wszystkich dzieci stwierdzono stężenia (<60 IU/ml). Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p < 0,001$).

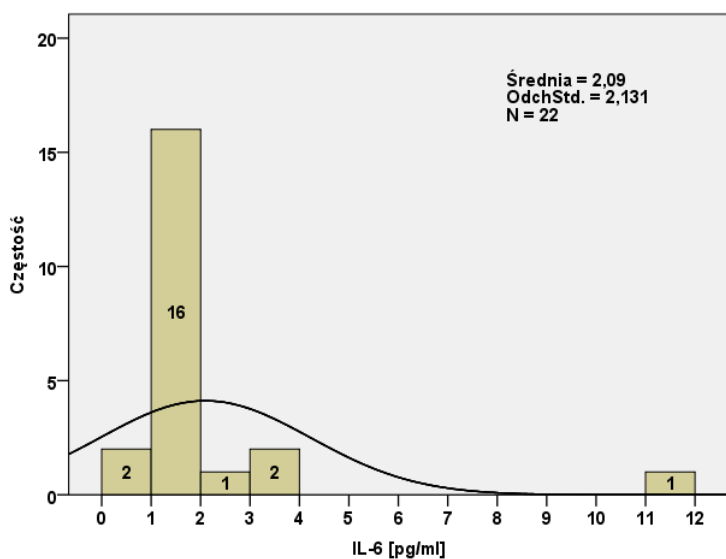


Wykres 32. Histogram stężenia

IL-6 w grupie dzieci

z nadczynnością tarczycy.

Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p < 0,001$).

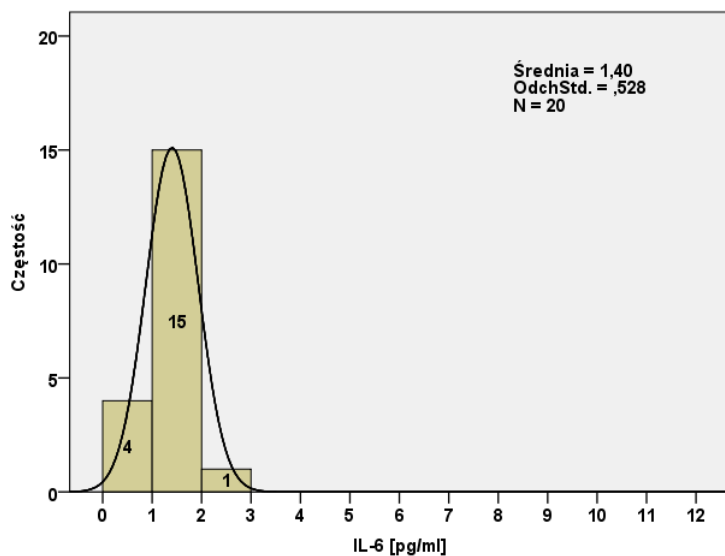


Wykres 33. Histogram stężenia

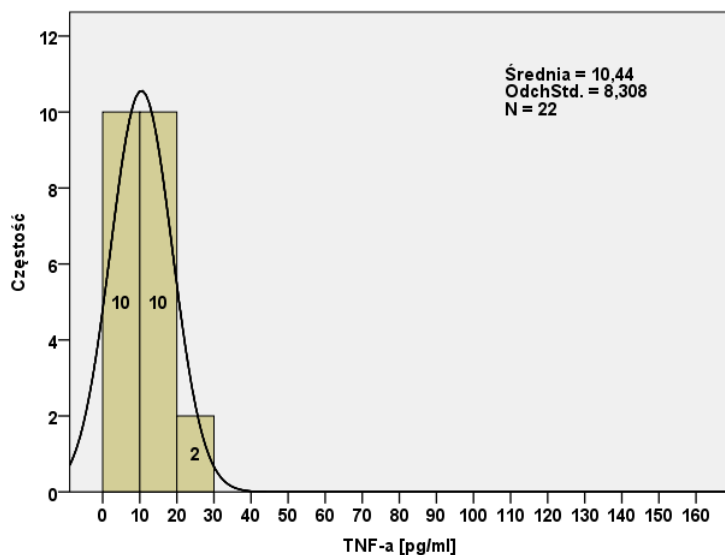
IL-6 w grupie dzieci

z niedoczynnością tarczycy.

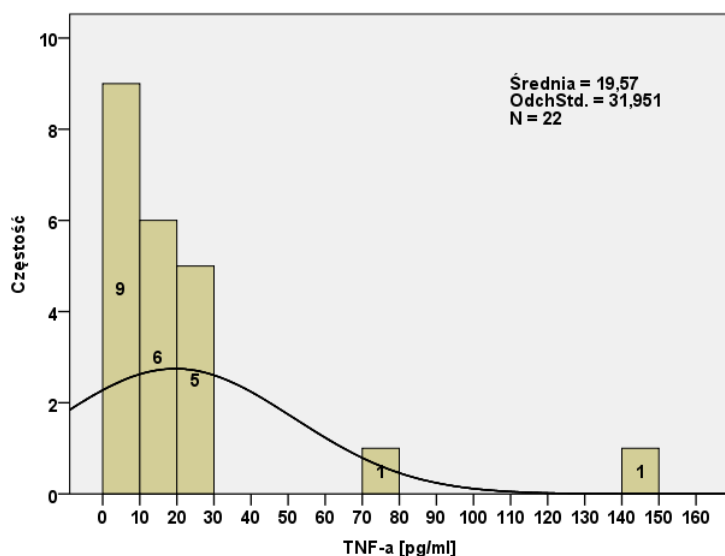
Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p < 0,001$).



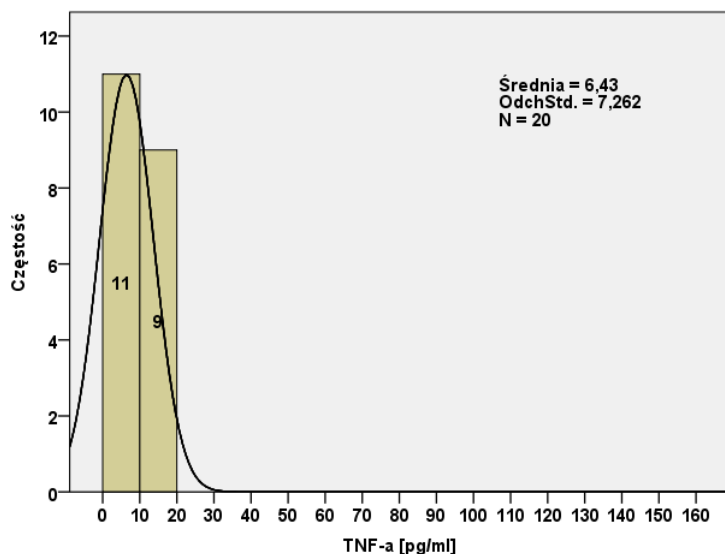
Wykres 34. Histogram stężenia IL-6 w grupie kontrolnej. Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,006$).



Wykres 35. Histogram stężenia TNF-α w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy. Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,042$).



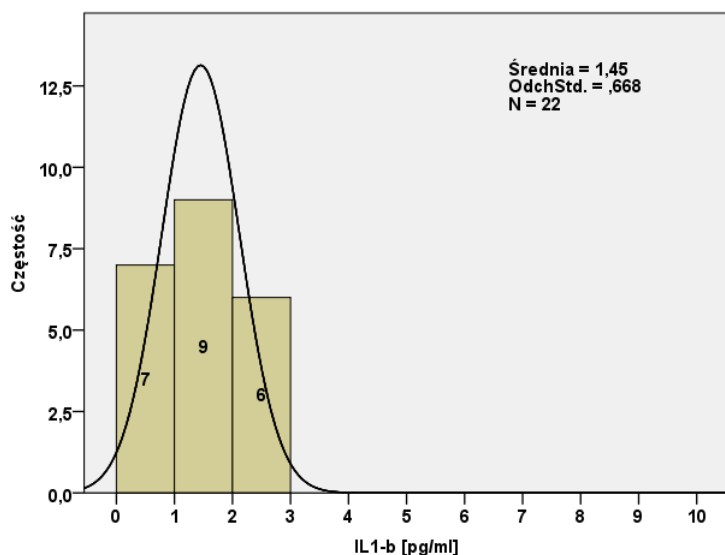
Wykres 36. Histogram stężenia TNF-α w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy. Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p<0,001$).



Wykres 37. Histogram stężenia

TNF- α w grupie kontrolnej.

Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,023$).

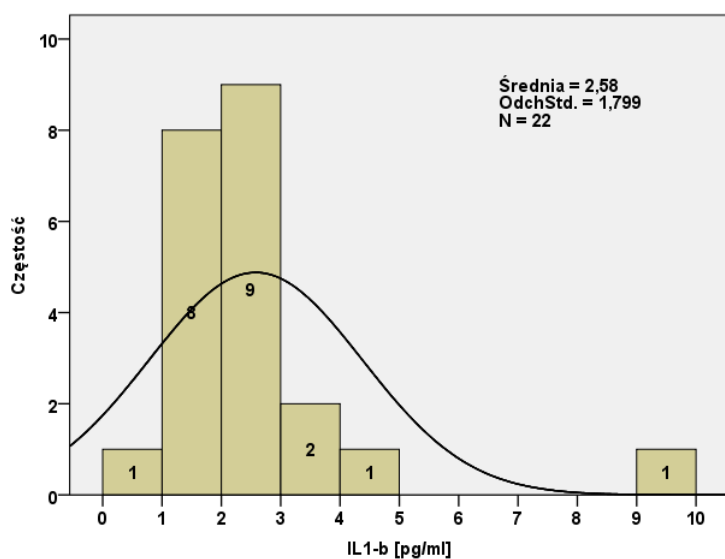


Wykres 38. Histogram stężenia

IL-1 β w grupie dzieci

z nadczynnością tarczycy.

Rozkład zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,357$).

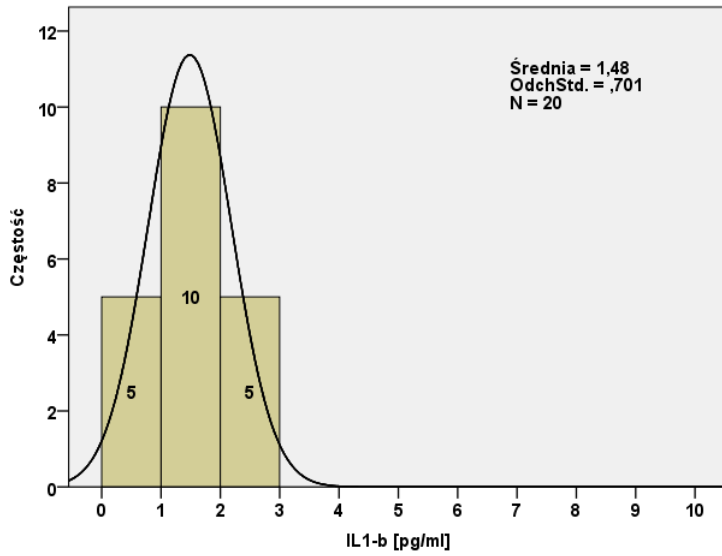


Wykres 39. Histogram stężenia

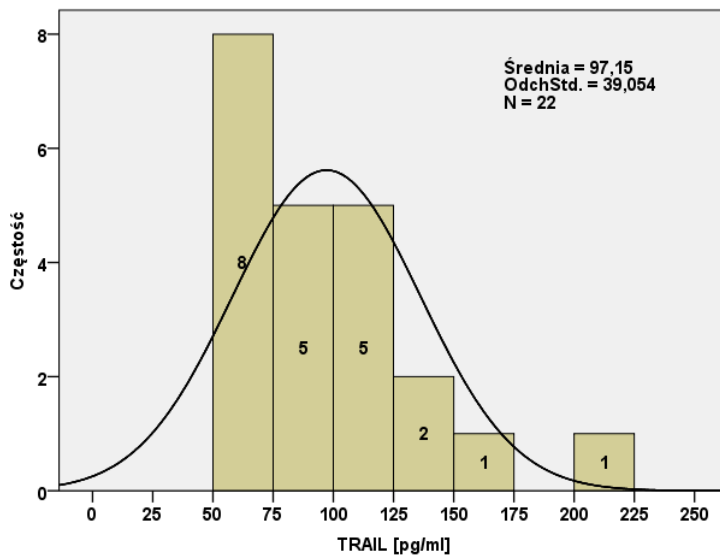
IL-1 β w grupie dzieci

z niedoczynnością tarczycy.

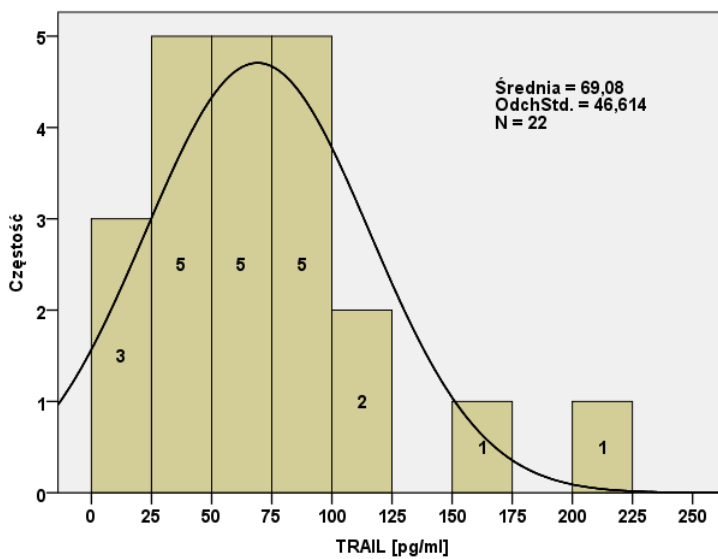
Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p<0,001$).



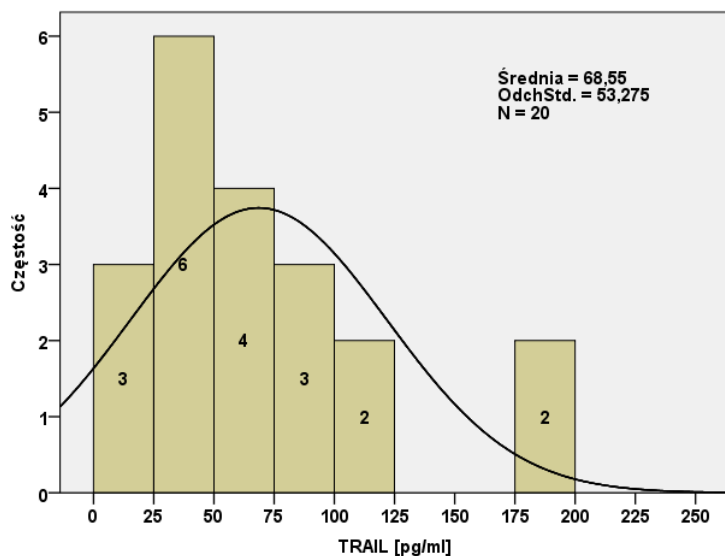
Wykres 40. Histogram stężenia IL-1 β w grupie kontrolnej.
Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk p=0,008).



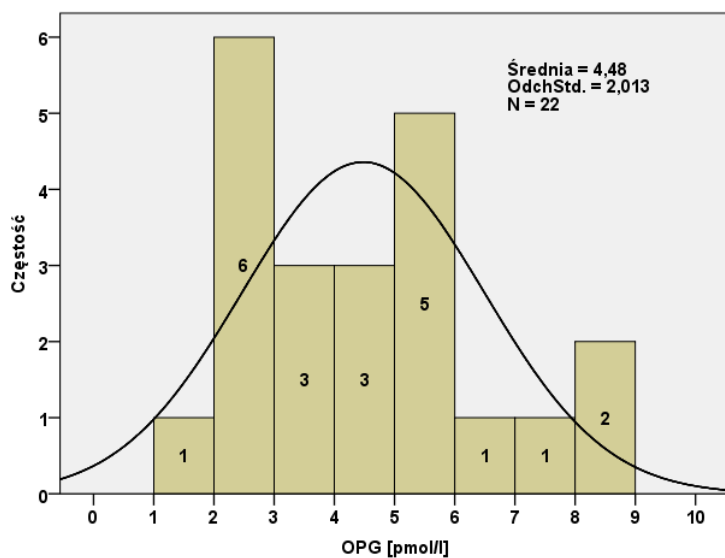
Wykres 41. Histogram stężenia TRAIL w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.
Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk p=0,014).



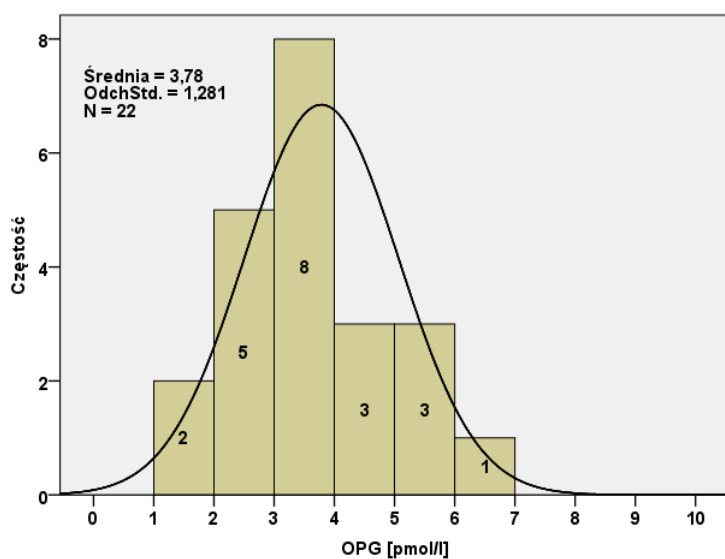
Wykres 42. Histogram stężenia TRAIL w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.
Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk p=0,016).



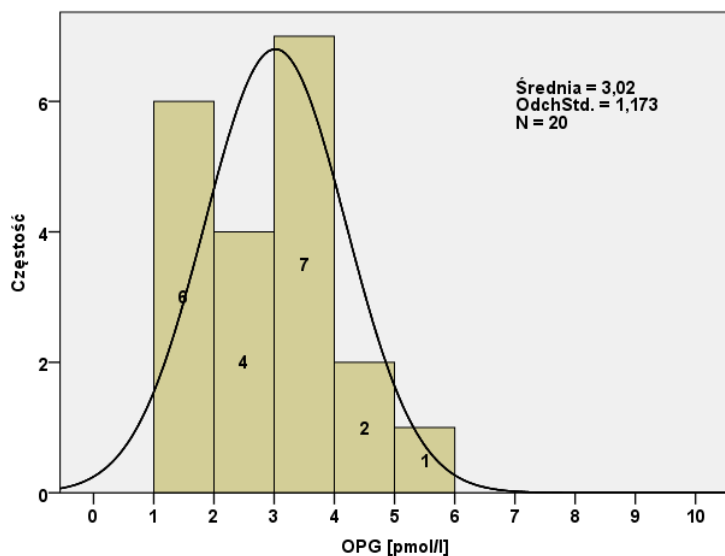
Wykres 43. Histogram stężenia TRAIL w grupie kontrolnej. Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,012$).



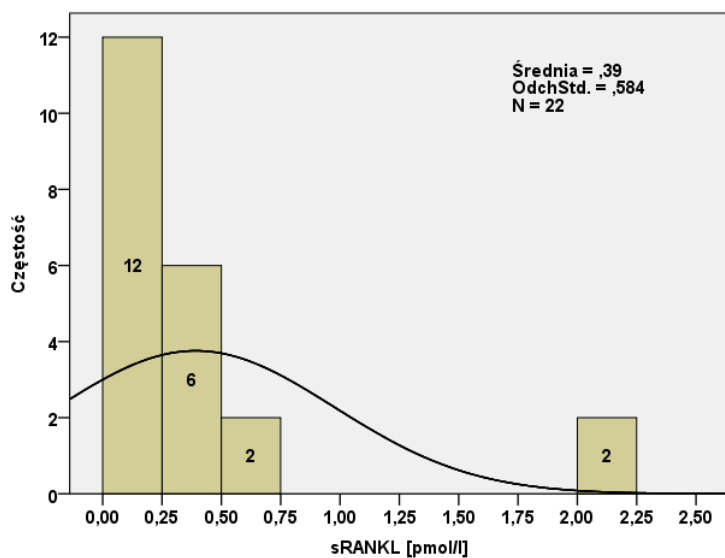
Wykres 44. Histogram stężenia OPG w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy. Rozkład zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,207$).



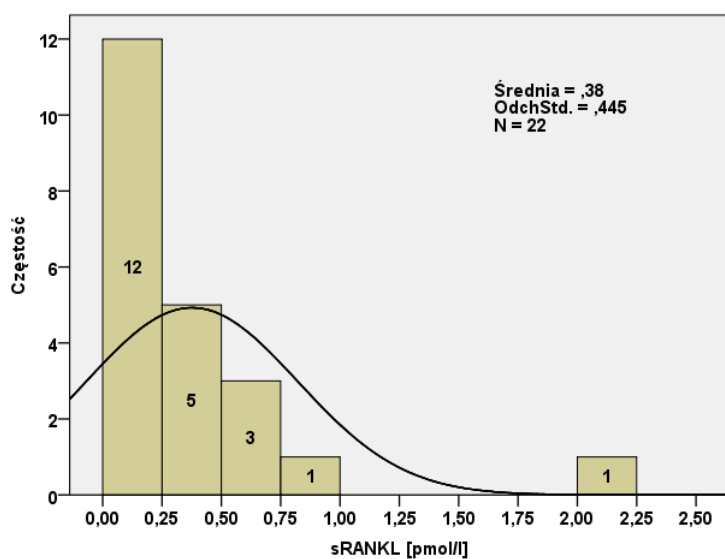
Wykres 45. Histogram stężenia OPG w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy. Rozkład zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,777$).



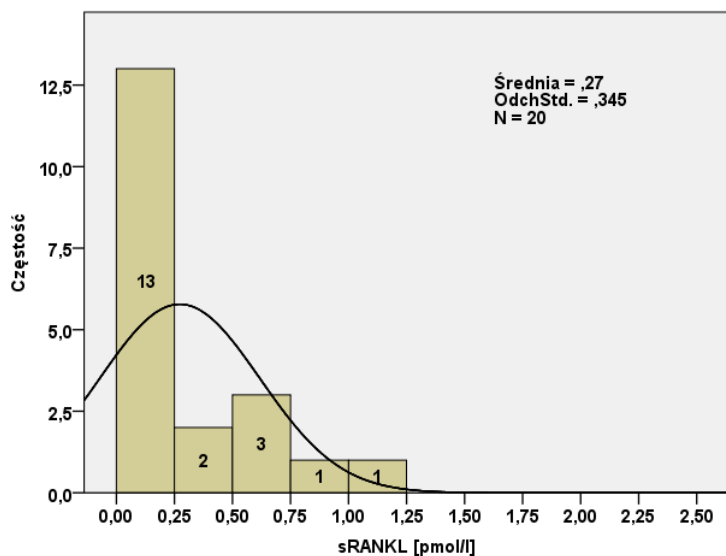
Wykres 46. Histogram stężenia OPG w grupie kontrolnej. Rozkład zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,256$).



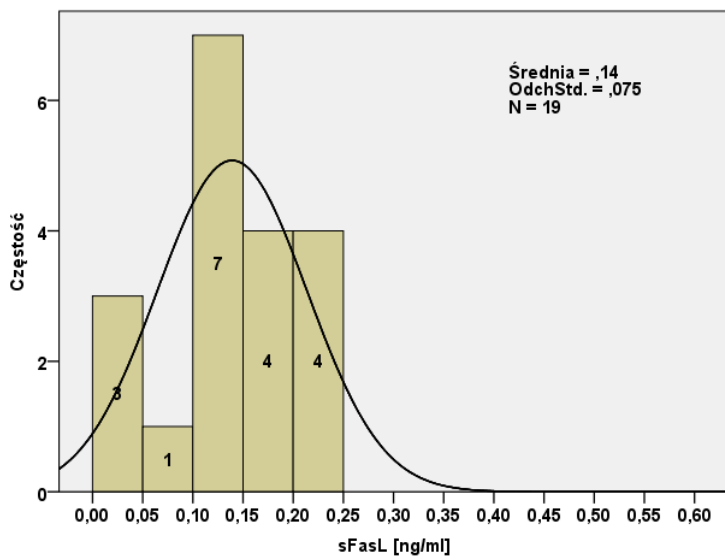
Wykres 47. Histogram stężenia sRANKL w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy. Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p<0,001$).



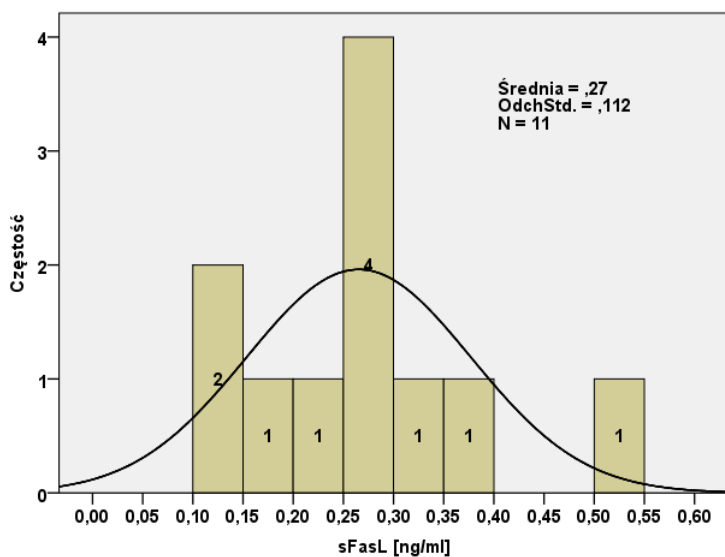
Wykres 48. Histogram stężenia sRANKL w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy. Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p<0,001$).



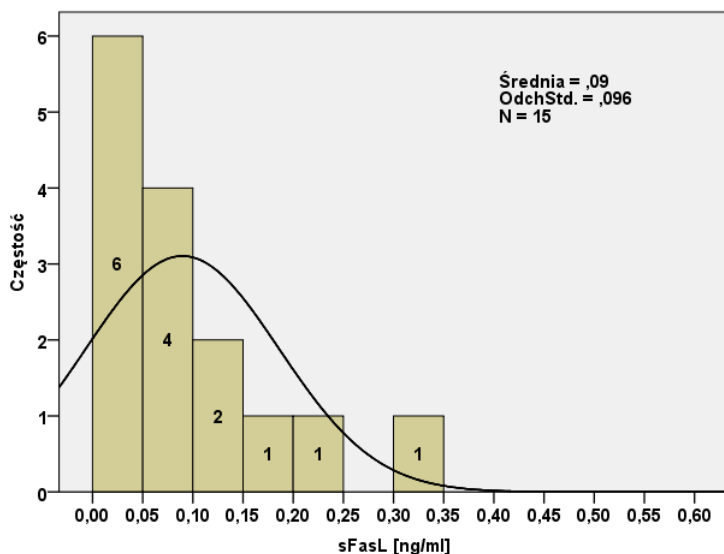
Wykres 49. Histogram stężenia sRANKL w grupie kontrolnej. Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p < 0,001$).



Wykres 50. Histogram stężenia sFasL w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy (oznaczenie wykonano u $n=19$ dzieci). Rozkład zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,226$).



Wykres 51. Histogram stężenia sFasL w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy (oznaczenie wykonano u $n=11$ dzieci). Rozkład zgodny z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,549$).



Wykres 52. Histogram stężenia sFasL w grupie kontrolnej. Brak zgodności rozkładu z rozkładem normalnym (Shapiro-Wilk $p=0,02$).

Histogramy częstości badanych parametrów i wykonanych oznaczeń - omówienie

Wiek pacjentów w grupie z nadczynnością tarczycy mieścił się w zakresie od 3 do 18 lat, w grupie z niedoczynnością tarczycy od 6 do 15 lat, a w grupie kontrolnej od 2 do 18 lat. Zarówno w grupie kontrolnej, jak i z nadczynnością tarczycy najwięcej, tj. $n=6$ dzieci stwierdzono w przedziale 14-16 lat; w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy najliczniejszy był przedział wieku 10-12 lat (Wykresy 2-4). Najwyższą medianę wieku (14,8 lat) stwierdzono w grupie z nadczynnością tarczycy, najniższą w grupie z niedoczynnością tarczycy (11,3 lat), w grupie kontrolnej mediana wieku wyniosła 12,7 roku (Tabela 9).

Stan odżywienia pacjentów oceniono przy pomocy następujących parametrów: wskaźnika masy ciała BMI, standaryzowanego BMI, tj. BMI-SDS (*Standard Deviation Score*) oraz wskaźnika Cole'a. W grupie dzieci z nadczynnością tarczycy BMI kształtowało się od 13,4 do 25,3 kg/m^2 , BMI-SDS od -2,17 do 1,97, a wskaźnik Cole'a od 71% do 124%. W grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy BMI mieściło się w zakresie 13,4 do 33,7 kg/m^2 (wartość maksymalna spośród wszystkich badanych grup), BMI-SDS -1,74–4,96, a wskaźnik Cole'a 77–162%. W grupie kontrolnej obserwowano wartości BMI pomiędzy 13,4 a 24,6 kg/m^2 , BMI-SDS -1,61 a 1,91 i wskaźnika Cole'a w zakresie 78–129%. Najwyższą medianę BMI i BMI-SDS stwierdzono w grupie z niedoczynnością tarczycy (kolejno 18,7 kg/m^2 i 0,3), najniższą w grupie kontrolnej (kolejno 17,3 kg/m^2 i -0,6), w grupie z nadczynnością tarczycy mediana BMI wyniosła 18,2 kg/m^2 , a mediana BMI-SDS -0,3. Najwyższą średnią wskaźnika Cole'a odnotowano również w grupie z niedoczynnością tarczycy (105%), najniższą w grupie kontrolnej (92%), pośrednią wartość stwierdzono w grupie z nadczynnością tarczycy (96%) (Tabela 9).

W odniesieniu do wartości prawidłowych BMI-SDS i wskaźnika Cole'a można poczynić następujące obserwacje co do badanych grup:

1. W grupie z **nadczynnością** tarczycy u n=1 pacjentki (4,5%) stwierdzono niedobór masy ciała tj. BMI poniżej dwóch odchyłek standardowych od średniej dla wieku (BMI-SDS=-2,17). Przeważająca część pacjentów miała BMI-SDS poniżej wartości średniej dla wieku (n=17). Natomiast według kryterium wskaźnika Cole'a u n=2 (9%) dzieci można rozpoznać wyniszczenie (<0,75), u n=5 dzieci (23%) niedowagę (0,75-0,89); u n=12 (54,5%) prawidłową masę ciała (0,9-1,09); u n=2 (9%) nadwagę (1,1-1,19) i u 1 pacjenta (4,5%) otyłość (>1,2) (Wykresy 5, 8, 11, Tabela 9).
2. W grupie z **niedoczynnością** tarczycy u dwojga pacjentów - jednej dziewczynki i jednego chłopca - stwierdzono otyłość, tj. BMI-SDS >2 (3; 4,96). Przeważająca część pacjentów miała BMI-SDS powyżej wartości średniej dla wieku (n=13). Według kryterium wskaźnika Cole'a u n=7 dzieci (32%) można rozpoznać niedowagę (0,75-0,89); u n=8 (36%) prawidłową masę ciała (0,9-1,09); u n=3 (14%) nadwagę (1,1-1,19) i u n=4 pacjentów (18%) otyłość (>1,2) (Wykresy 6, 9, 12, Tabela 9).
3. W grupie **kontrolnej** u wszystkich pacjentów stwierdzono prawidłową masę ciała przyjmując kryterium BMI-SDS, które mieściło się w zakresie (-2; 2). Według kryterium wskaźnika Cole'a u n=7 dzieci (35%) można rozpoznać niedowagę (75-89%); u n=10 (50%) prawidłową masę ciała (90-109%); u n=1 (5%) nadwagę (110-119%) i u n=2 dzieci (10%) otyłość (>120%) (Wykresy 7, 10, 13, Tabela 9).

Parametry hormonalnej (stężenie TSH, fT3, fT4) i autoimmunologicznej (przeciwciała TRAb, ATG i ATPO) funkcji tarczycy wykazywały znaczne zróżnicowanie w zależności od badanej grupy dzieci - stanu nadczynności, niedoczynności tarczycy i eutyreozy:

1. W grupie dzieci z **nadczynnością** tarczycy u wszystkich (n=22, 100%) dzieci stwierdzono ekstremalną supresję TSH (stężenia w zakresie 0–0,03 μ IU/ml, znacznie poniżej dolnej granicy normy równej 0,49 μ IU/ml). Stwierdzono także podwyższone stężenie fT4 (u 100% pacjentów w zakresie 2,26–6,0 ng/dl, powyżej górnej granicy normy równej 1,85 ng/dl). Podobnie zaobserwowano znacznie podwyższone stężenie fT3 (u 100% dzieci w przedziale 5,92–26,5 pg/ml, również powyżej górnej granicy normy wynoszącej 3,48 pg/ml). Stwierdzono również dodatnie stężenie TRAb u (100%, >1,5 U/l) oraz znacznie podwyższone stężenie ATG u (100%, >60 IU/ml). Natomiast podwyższone stężenie przeciwciał ATPO (>60 IU/ml) w badanej grupie z nadczynnością tarczycy obserwowano u 95,5% dzieci (n=21) a u jednego pacjenta (n=1; 4,5%) w tej grupie stężenie ATPO było prawidłowe. Mediana stężenia TSH w tej grupie wyniosła 0 μ IU/ml i była to najniższa mediana wśród trzech grup badanych dzieci. Średnie stężenie fT4 wynosiło 4,24 ng/dl (najwyższe z obserwowanych), a

średnie stężenie fT3 było równa 19,01 pg/ml (również najwyższe wśród badanych grup pacjentów). Mediana stężenia TRAb była równa 16,75 IU/l (i była najwyższa). Mediana stężenia ATG wynosiła 101,5 IU/ml (i była wartością pośrednią, pomiędzy medianą stężenia w grupie z nadczynnością tarczycy i kontrolną). Natomiast mediana stężenia ATPO wynosząca 3000 IU/ml (stanowiła wartość najwyższą w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy, równą wartości ATPO oznaczonej w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.) (Wykresy 14, 17, 20, 23, 26. 29; Tabela 9).

2. W grupie z **niedoczynnością** tarczycy u wszystkich badanych (100%) stwierdzono podwyższone stężenie TSH (w przedziale 5,35–220 μ IU/ml, powyżej górnej granicy zakresu referencyjnego 4,67 μ IU/ml). U n=16 (64%) pacjentów stwierdzono obniżone stężenie fT4 (<0,71 ng/dl), u pozostałych n=8 (36%) stężenie było w dolnej granicy zakresu (0,71 ng/dl). U n=5 (23%) dzieci stwierdzono obniżone stężenie fT3 (<1,45 pg/ml), a u pozostałych n=17 (77%) w zakresie (1,45-3,48 pg/ml). Stężenie przeciwciał TRAb u n=14 (87,5%) dzieci było ujemne (<1 U/l), a u pozostałych (n=2, 12,5%) było wątpliwe - mieszczące się w szarej strefie (1 -1,5 U/l). U n=15 dzieci (75%) w grupie z niedoczynnością tarczycy stwierdzono podwyższone (>60 IU/ml) stężenie przeciwciał ATG – w tym ekstremalnie wysokie > 2000 IU/ml, a u n=5 dzieci (25%) stwierdzono prawidłowe stężenie ATG(<60 IU/ml). U wszystkich dzieci stwierdzono podwyższone stężenie ATPO (100%, >60 IU/ml), w tym przeważające wartości ekstremalnie wysokie >3000 IU/ml. (Wykresy 15, 18, 21, 24, 27. 30; Tabela 6). Mediana stężenia TSH w tej grupie wyniosła 37,34 μ IU/ml (i była najwyższą obserwowaną medianą w badanych grupach), natomiast średnie stężenie fT4 równe 0,54 ng/dl (było najniższe wśród badanych grup i poniżej zakresu referencyjnego). Średnie stężenie fT3 wyniosło 2,1 pg/ml (również było najniższe ze średnich w badanych grupach). Mediana stężenia TRAb w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy wynosiła 0,65 IU/l (była to wartość pośrednia mediany), natomiast mediana stężenia ATG=124 IU/ml (była najwyższą medianą w badanych grupach dzieci), oraz mediana stężenia ATPO 3000 IU/ml (również stanowiła wartość najwyższą, równą wartości w grupie z nadczynnością) (Wykresy 15, 18, 21, 24, 27. 30; Tabela 9).
3. W grupie **kontrolnej** wszystkie badane parametry hormonalne (stężenie TSH, fT3, fT4,) oraz immunologiczne (przeciwciała TRAb, ATG i ATPO) mieściły się w zakresie referencyjnym. Mediana stężenia TSH w tej grupie wyniosła 2,42 μ IU/ml (stanowiła wartość pośrednią), średnie stężenie fT4=1,03 ng/dl (stanowiło wartość pośrednią), średnie stężenie fT3=2,7 pg/ml (również była wartością pośrednią), mediana stężenia TRAb=0,5 IU/l (była najniższą medianą), mediana stężenia ATG=20 IU/ml (również najniższa obserwowana), oraz mediana stężenia ATPO=10 IU/ml (również była

najniższą medianą obserwowaną w badanych grupach dzieci.) (Wykresy 16, 19, 22, 25, 28, 31; Tabela 9).

Stężenia oznaczanych cytokin

Stężenie IL-6 w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy mieściło się w zakresie: 0,39–9,18 pg/ml. W grupie z niedoczynnością tarczycy obserwowano stężenie IL-6 w zakresie od 0,39 do 11,1 pg/ml (wartość maksymalna) a w grupie kontrolnej stężenie IL-6 mieściło się od 0,12 do 2,48 pg/ml. We wszystkich badanych grupach przedział stężenia IL-6 (1-2 pg/ml) był najbardziej liczny. Mediany stężenia IL-6 w grupie nadczynnością i niedoczynnością tarczycy były równe (1,6 pg/ml), najniższą medianę zaobserwowano w grupie kontrolnej (1,56 pg/ml) (Wykresy 32-34, Tabela 9).

Stężenie TNF- α w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy wynosiło od 0 do 28,51 pg/ml, a w grupie z niedoczynnością tarczycy od 0 do 143,44 pg/ml (maksimum) oraz w grupie kontrolnej od 0 do 17,75 pg/ml. W grupie z nadczynnością tarczycy przedziały 0-10 i 10-20 pg/ml były równoliczne (n=10; 45,5%), w grupach z niedoczynnością tarczycy i kontrolnej najliczniejszy był przedział 0-10 pg/ml (kolejno n=9; 40,9% i n=11; 50%). Najwyższą medianę stężenia stwierdzono w grupie z niedoczynnością tarczycy (15,08 pg/ml), a najniższą w grupie kontrolnej (0,96 pg/ml), natomiast w grupie z nadczynnością tarczycy mediana stężenia TNF- α wyniosła 13,63 pg/ml (Wykresy 35-37, Tabela 9).

Obserwowane stężenie IL-1 β w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy mieściło się w zakresie: 0,26–2,68 pg/ml, w grupie z niedoczynnością tarczycy w zakresie: 0,11–9,53 pg/ml (maksimum) i w grupie kontrolnej: 0,01 (minimum) – 2,38 pg/ml. Przedział (2-3 pg/ml) osiągał maksymalną licznosc w grupie z niedoczynnością tarczycy (n=9; 40,9%). W grupach z nadczynnością tarczycy i kontrolnej najliczniejszy był przedział o niższym stężeniu (1-2 pg/ml), (kolejno n=9; 40,9% i n=10; 45,5%). Najwyższą medianę stężenia stwierdzono w grupie z niedoczynnością tarczycy (2,16 pg/ml), najniższą medianę, co ciekawe, w grupie z nadczynnością tarczycy (1,39 pg/ml), natomiast w grupie kontrolnej mediana stężenia IL-1 β wyniosła 1,88 pg/ml (i była wartością pośrednią). (Wykresy 38-40, Tabela 9).

Stężenie TRAIL w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy kształtowało się w zakresie od 52,31 do 215,34 pg/ml (maksimum), w grupie z niedoczynnością tarczycy w zakresie: 5,9 – 208,85 pg/ml, natomiast w grupie kontrolnej od 1,04 (minimum) do 194,59 pg/ml. W grupie dzieci z nadczynnością tarczycy najliczniejszym przedziałem stężenia TRAIL był przedział (50-75 pg/ml), (n=8; 36,4%). W grupie dzieci z niedoczynnością maksymalne, równoliczne przedziały to: (25-50, 50-75, 75-100 pg/ml,) w sumie u n=15 (68,2%) dzieci. Natomiast w

grupie kontrolnej najliczniejszy przedział stężenia TRAIL to (25-50 pg/ml), (n=8; 40%). Najwyższą medianę stężenia TRAIL stwierdzono w grupie z nadczynnością tarczycy (88,06 pg/ml), najniższą w grupie kontrolnej (60,66 pg/ml), a w grupie z niedoczynnością tarczycy mediana stężenia TRAIL wyniosła 62,43 pg/ml (Wykresy 41-43, Tabela 9).

Stężenie OPG w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy mieściło się w zakresie od 1,17 (minimum) do 8,3 pmol/l (maksimum). W grupie z niedoczynnością tarczycy stężenie OPG wynosiło od 1,6 do 6,37 pmol/l, a w grupie kontrolnej od 1,46 do 5,51 pmol/l. Najliczniejszym przedziałem w grupie z nadczynnością tarczycy był przedział (2-3 pmol/l), (n=6; 27,3%). Natomiast w grupach dzieci z niedoczynnością tarczycy i w kontrolnej był to przedział (3-4 pmol/l), (kolejno n=8; 36,4% i n=7; 35%). Najwyższe średnie stężenie OPG stwierdzono w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy (4,48 pmol/l), najniższe średnie stężenie w grupie kontrolnej (3,02 pmol/l). W grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy mediana stężenia OPG wyniosła 3,79 pmol/l (Wykresy 44-46, Tabela 9).

Stężenie sRANKL w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy kształtowało się od 0 do 2,1 pmol/l (maksimum), oraz w takim samym zakresie w grupie z niedoczynnością tarczycy: od 0 do 2,1 pmol/l (również maksimum). Natomiast w grupie kontrolnej zakres stężeń sRANKL był niższy i wynosił od 0 do 1,21 pmol/l. Najliczniejszym przedziałem stężenia sRANKL we wszystkich grupach był przedział od 0 do 0,25 pmol/l, (n=12; 54,5% w grupach z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy i n=13; 65% w grupie kontrolnej). Najwyższą medianę stężenia sRANKL stwierdzono w grupie z niedoczynnością tarczycy (0,23 pmol/l), najniższą w grupie kontrolnej (0,09 pmol/l), a w grupie z nadczynnością tarczycy mediana stężenia sRANKL wyniosła 0,2 pmol/l (Wykresy 47-49, Tabela 9).

Stężenie sFasL w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy kształtowało się od 0 (minimum) do 0,25 ng/ml. W grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy był to zakres od 0,11 do 0,5 ng/ml (maksimum), natomiast w grupie kontrolnej od 0 do 0,34 ng/ml. W grupie dzieci z nadczynnością tarczycy najliczniejszym przedziałem stężenia sFasL był przedział (0,1–0,15 ng/ml), (n=7; 36,8%), a w grupie z niedoczynnością tarczycy przedział 0,25–0,3 ng/ml, (n=4; 36,3%). Natomiast w grupie kontrolnej najwięcej wyników znalazło się w zakresie 0–0,05 ng/ml, (n=6; 40%). Najwyższą medianę stężenia sFasL stwierdzono w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy (0,26 ng/ml), najniższą w grupie kontrolnej (0,06 ng/ml), w grupie z nadczynnością tarczycy mediana stężenia sFasL wyniosła 0,14 ng/ml. (Wykresy 50-52, Tabela 9).

4.2. Porównanie badanych parametrów w badanych grupach dzieci - różnice i korelacje

Różnice badanych parametrów z uwzględnieniem podziału na płeć w grupach dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy oraz w grupie kontrolnej

Różnice w grupie dzieci z **nadczynnością tarczycy** w zależności od płci przedstawiono w Tabeli 13.

Tabela 13. Zestawienie istotności różnic w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy w zależności od płci

	Płeć	n	Średnia	Mediana	Test / istotność
Wiek [lata]	dziewczynki	16	11,95	13,94	(MW) / p=0,19 (ns)
	chłopcy	6	14,62	16,01	
BMI [kg/m ²]	dziewczynki	16	18,41	17,30	(t-test) / p=0,72 (ns)
	chłopcy	6	17,81	18,57	
BMI SDS	dziewczynki	16	-0,19	-0,11	(t-test) / p=0,18 (ns)
	chłopcy	6	-0,88	-0,85	
wskaźnik Cole'a [bezwgl.]	dziewczynki	16	0,98	0,99	(t-test) / p=0,11 (ns)
	chłopcy	6	0,88	0,90	
TSH [μ IU/ml]	dziewczynki	16	0,01	0,00	(MW) / p=0,53 (ns)
	chłopcy	6	0,01	0,00	
fT4 [ng/dl]	dziewczynki	16	4,09	4,03	(t-test) / p=0,29 (ns)
	chłopcy	6	4,63	4,52	
fT3 [pg/ml]	dziewczynki	16	17,91	19,10	(t-test) / p=0,11 (ns)
	chłopcy	6	21,95	20,63	
TRAb [IU/l]	dziewczynki	16	24,64	16,75	(MW) / p=0,94 (ns)
	chłopcy	6	22,48	20,70	
ATG [IU/ml]	dziewczynki	16	415,77	112,00	(MW) / p=0,56 (ns)
	chłopcy	6	455,17	101,50	
ATPO [IU/ml]	dziewczynki	16	2395,63	3000,00	(MW) / p=0,22 (ns)
	chłopcy	6	1972,33	2037,50	
IL-6 [pg/ml]	dziewczynki	16	1,75	1,60	(MW) / p=0,97 (ns)
	chłopcy	6	2,53	1,60	
TNF- α [pg/ml]	dziewczynki	16	10,68	13,63	(t-test) / p=0,83 (ns)
	chłopcy	6	9,81	10,14	
IL-1 β [pg/ml]	dziewczynki	16	1,45	1,34	(t-test) / p=0,99 (ns)
	chłopcy	6	1,45	1,59	
TRAIL [pg/ml]	dziewczynki	16	90,66	85,89	(t-test) / p=0,21 (ns)
	chłopcy	6	114,46	102,43	
OPG [pmol/l]	dziewczynki	16	4,48	4,68	(t-test) / p=0,99 (ns)
	chłopcy	6	4,48	4,21	
sRANKL [pmol/l]	dziewczynki	16	0,49	0,32	(MW) / p=0,14 (ns)
	chłopcy	6	0,13	0,10	
sFasL [ng/ml]	dziewczynki	15	0,14	0,14	(t-test) / p=0,92 (ns)
	chłopcy	4	0,14	0,12	

Stwierdzono brak istotnych różnic otrzymanych wyników pomiędzy dziewczynkami i chłopcami w grupie z nadczynnością tarczycy, co jest korzystne z punktu widzenia analizy statystycznej (reprezentatywność grupy).

Różnice w grupie dzieci z **niedoczynnością tarczycy** w zależności od płci przedstawiono w poniższej Tabeli 14.

Tabela 14. Zestawienie różnic w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy w zależności od płci

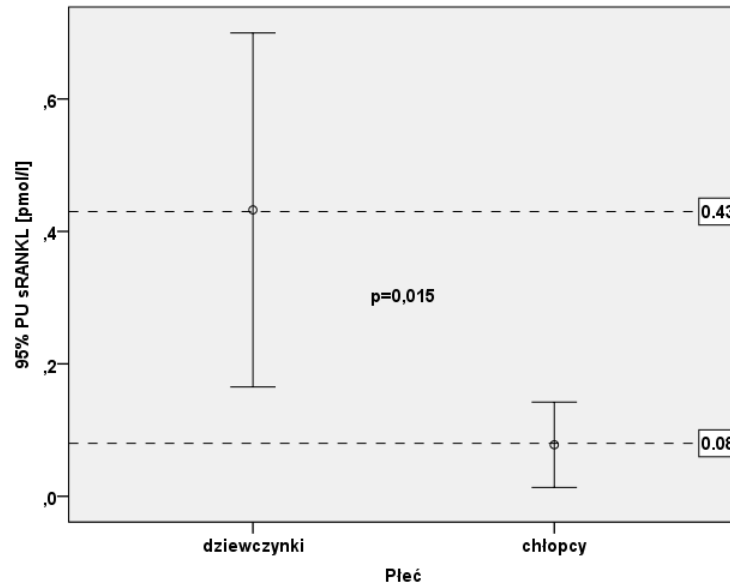
	Płeć	n	Średnia	Mediana	Test / istotność
Wiek [lata]	dziewczynki	18	11,88	11,69	(t-test) / p=0,67 (ns)
	chłopcy	4	9,18	9,42	
BMI [kg/m ²]	dziewczynki	18	19,21	19,44	(MW) / p=0,8 (ns)
	chłopcy	4	19,01	18,34	
BMI SDS	dziewczynki	18	0,27	0,32	(MW) / p=0,87 (ns)
	chłopcy	4	0,58	0,19	
wskaźnik Cole'a [bezwgl.]	dziewczynki	18	1,03	1,05	(t-test) / p=0,54 (ns)
	chłopcy	4	1,11	1,03	
TSH [μIU/ml]	dziewczynki	18	41,96	31,29	(MW) / p=0,11 (ns)
	chłopcy	4	68,36	70,00	
fT4 [ng/dl]	dziewczynki	18	0,55	0,61	(t-test) / p=0,8 (ns)
	chłopcy	4	0,51	0,53	
fT3 [pg/ml]	dziewczynki	18	2,07	2,25	(t-test) / p=0,81 (ns)
	chłopcy	4	2,21	2,31	
TRAb [IU/l]	dziewczynki	14	0,74	0,80	(MW) / p=0,72 (ns)
	chłopcy	2	0,30	0,30	
ATG [IU/ml]	dziewczynki	16	505,74	107,50	(MW) / p=0,48 (ns)
	chłopcy	4	645,75	262,00	
ATPO [IU/ml]	dziewczynki	18	2628,78	3000,00	(MW) / p=0,91 (ns)
	chłopcy	4	2456,25	3000,00	
IL-6 [pg/ml]	dziewczynki	18	2,23	1,60	(MW) / p=0,93 (ns)
	chłopcy	4	1,50	1,60	
TNF-α [pg/ml]	dziewczynki	18	22,06	15,08	(MW) / p=0,47 (ns)
	chłopcy	4	8,38	8,49	
IL-1β [pg/ml]	dziewczynki	18	2,73	2,16	(MW) / p=0,9 (ns)
	chłopcy	4	1,90	2,31	
TRAIL [pg/ml]	dziewczynki	18	69,94	56,80	(MW) / p=0,87 (ns)
	chłopcy	4	65,21	74,06	
OPG [pmol/l]	dziewczynki	18	3,74	3,64	(t-test) / p=0,74 (ns)
	chłopcy	4	3,98	4,20	
sRANKL [pmol/l]	dziewczynki	18	0,42	0,36	(MW) / p=0,17 (ns)
	chłopcy	4	0,16	0,15	
sFasL [ng/ml]	dziewczynki	10	0,27	0,26	(MW) / p=0,75 (ns)
	chłopcy	1	0,27	0,27	

Stwierdzono również brak istotnych różnic wyników pomiędzy dziewczynkami i chłopcami w grupie z niedoczynnością tarczycy.

W **grupie kontrolnej** nie stwierdzono istotnych różnic wartości analizowanych zmiennych ze względu na płeć poza różnicą stężenia sRANKL – obserwowano istotnie wyższe stężenie u dziewcząt (średnio 0,43 pmol/l) w porównaniu do chłopców (średnio 0,08 pmol/l; $p=0,015$). Wyniki przedstawiono w poniższej Tabeli 15 i na Wykresie 53.

Tabela 15. Istotność różnic w grupie kontrolnej w zależności od płci

	Płeć	n	Średnia	Mediana	Test / istotność
Wiek [lata]	dziewczynki	11	13,10	14,70	(t-test) / $p=0,12$ (ns)
	chłopcy	9	9,70	9,12	
BMI [kg/m ²]	dziewczynki	11	18,86	17,93	(t-test) / $p=0,35$ (ns)
	chłopcy	9	17,34	16,42	
BMI SDS	dziewczynki	11	-0,10	-0,58	(t-test) / $p=0,75$ (ns)
	chłopcy	9	-0,26	-0,52	
wsk. Cole'a [bezwgl.]	dziewczynki	11	0,98	0,92	(t-test) / $p=0,66$ (ns)
	chłopcy	9	0,96	0,92	
TSH [μ IU/ml]	dziewczynki	11	1,97	1,48	(MW) / $p=0,16$ (ns)
	chłopcy	9	2,67	2,49	
fT4 [ng/dl]	dziewczynki	11	1,01	1,01	(t-test) / $p=0,34$ (ns)
	chłopcy	9	1,06	1,06	
fT3 [pg/ml]	dziewczynki	11	2,63	2,56	(t-test) / $p=0,56$ (ns)
	chłopcy	9	2,78	2,92	
TRAb [IU/l]	dziewczynki	4	0,43	0,45	(t-test) / $p=0,43$ (ns)
	chłopcy	3	0,63	0,70	
ATG [IU/ml]	dziewczynki	11	18,45	20,00	(MW) / $p=0,82$ (ns)
	chłopcy	9	19,44	20,00	
ATPO [IU/ml]	dziewczynki	11	10,91	8,00	(MW) / $p=0,51$ (ns)
	chłopcy	9	17,33	25,00	
IL-6 [pg/ml]	dziewczynki	11	1,45	1,60	(MW) / $p=0,42$ (ns)
	chłopcy	9	1,34	1,56	
TNF- α [pg/ml]	dziewczynki	11	5,61	0,38	(MW) / $p=0,84$ (ns)
	chłopcy	9	7,42	11,04	
IL-1 β [pg/ml]	dziewczynki	11	1,52	1,88	(MW) / $p=0,79$ (ns)
	chłopcy	9	1,44	1,77	
TRAIL [pg/ml]	dziewczynki	11	62,95	67,74	(MW) / $p=0,62$ (ns)
	chłopcy	9	75,40	46,34	
OPG [pmol/l]	dziewczynki	11	3,31	3,31	(MW) / $p=0,16$ (ns)
	chłopcy	9	2,66	1,89	
sRANKL [pmol/l]	dziewczynki	11	0,43	0,41	(t-test) / $p=0,015$ (s*)
	chłopcy	9	0,08	0,05	
sFasL [ng/ml]	dziewczynki	7	0,12	0,08	(t-test) / $p=0,31$ (ns)
	chłopcy	8	0,07	0,06	



Wykres 53. Różnica stężenia sRANKL w grupie kontrolnej pomiędzy dziewczynkami i chłopcami (test t-Student'a; $p=0,015$)

Różnice badanych parametrów i wykonanych oznaczeń w grupach dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy oraz w grupie kontrolnej

Przeanalizowano istotność różnic badanych parametrów między badanymi grupami, podsumowanie zamieszczono w poniższej Tabeli 16.

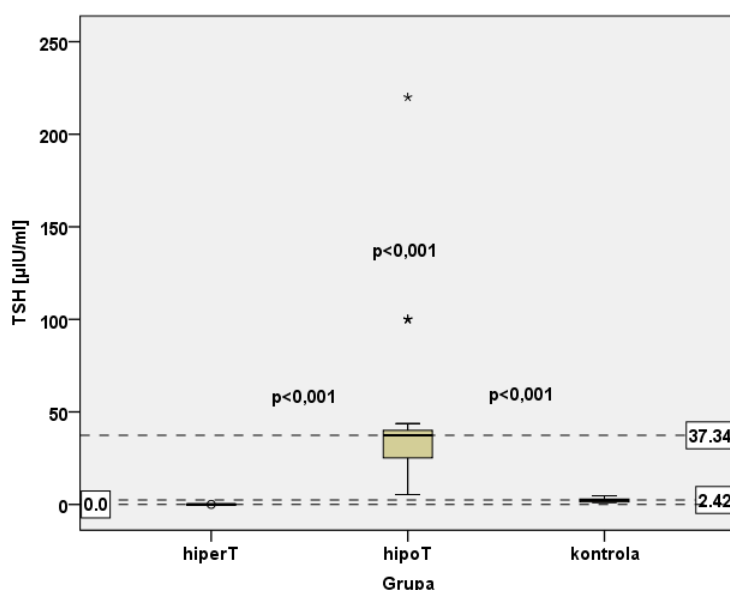
Tabela 16. Zestawienie istotności różnic wyników między grupami dzieci

	Grupa	n	Średnia	Mediana	Test / istotność	Test post-hoc (Kruskal-Wallis: test Dunn'a / ANOVA: test Newman'a-Keuls'a)
Wiek [lata]	hiperT	22	12,68	14,75	K-W / p=0,31 (ns)	
	hipoT	22	11,39	11,30		
	kontrola	20	11,57	12,72		
BMI [kg/m ²]	hiperT	22	18,25	18,21	K-W / p=0,8 (ns)	
	hipoT	22	19,18	18,69		
	kontrola	20	18,17	17,29		
BMI SDS	hiperT	22	-0,38	-0,28	K-W / p=0,31 (ns)	
	hipoT	22	0,33	0,30		
	kontrola	20	-0,17	-0,55		
wskaźnik Cole'a [bezwgl.]	hiperT	22	0,95	0,96	ANOVA / p=0,15 (ns)	
	hipoT	22	1,05	1,05		
	kontrola	20	0,97	0,92		
TSH [μIU/ml]	hiperT	22	0,01	0,00	K-W / p<0,001 (s ^{***})	hipoT vs. hiperT: p<0,001 (s ^{***}) hipoT vs. kontrola: p<0,001 (s ^{***}) hiperT vs. kontrola: p<0,001 (s ^{***})
	hipoT	22	46,76	37,34		
	kontrola	20	2,28	2,42		
fT4 [ng/dl]	hiperT	22	4,24	4,22	ANOVA / p<0,001 (s ^{***})	hipoT vs. hiperT: p<0,001 (s ^{***}) hipoT vs. kontrola: p<0,05 (s [*]) hiperT vs. kontrola: p<0,001 (s ^{***})
	hipoT	22	0,54	0,61		
	kontrola	20	1,03	1,05		
fT3 [pg/ml]	hiperT	22	19,01	20,21	ANOVA / p<0,001 (s ^{***})	hipoT vs. hiperT: p<0,001 (s ^{***}) hipoT vs. kontrola: p>0,05 (ns) hiperT vs. kontrola: p<0,001 (s ^{***})
	hipoT	22	2,10	2,28		
	kontrola	20	2,70	2,72		
TRAb [IU/l]	hiperT	22	24,05	16,75	K-W / p<0,001 (s ^{***})	hipoT vs. hiperT: p<0,001 (s ^{***}) hipoT vs. kontrola: p>0,05 (ns) hiperT vs. kontrola: p<0,001 (s ^{***})
	hipoT	16	0,69	0,65		
	kontrola	7	0,51	0,50		
ATG [IU/ml]	hiperT	22	426,51	101,50	K-W / p<0,001 (s ^{***})	hipoT vs. hiperT: p>0,05 (ns) hipoT vs. kontrola: p<0,001 (s ^{***}) hiperT vs. kontrola: p<0,001 (s ^{***})
	hipoT	20	533,75	124,00		
	kontrola	20	18,90	20,00		
ATPO [IU/ml]	hiperT	22	2280,18	3000,00	K-W / p<0,001 (s ^{***})	hipoT vs. hiperT: p>0,05 (ns) hipoT vs. kontrola: p<0,001 (s ^{***}) hiperT vs. kontrola: p<0,001 (s ^{***})
	hipoT	22	2597,41	3000,00		
	kontrola	20	13,80	10,00		
IL-6 [pg/ml]	hiperT	22	1,96	1,60	K-W / p=0,48 (ns)	
	hipoT	22	2,09	1,60		
	kontrola	20	1,40	1,56		
TNF-α [pg/ml]	hiperT	22	10,44	13,63	K-W / p=0,067 (ns)	
	hipoT	22	19,57	15,08		
	kontrola	20	6,43	0,96		
IL-1β [pg/ml]	hiperT	22	1,45	1,39	K-W / p=0,002 (s ^{**})	hipoT vs. hiperT: p<0,01 (s ^{**}) hipoT vs. kontrola: p<0,05 (s [*]) hiperT vs. kontrola: p>0,05 (ns)
	hipoT	22	2,58	2,16		
	kontrola	20	1,48	1,88		
TRAIL [pg/ml]	hiperT	22	97,15	88,06	K-W / p=0,013 (s [*])	hipoT vs. hiperT: p<0,05 (s [*]) hipoT vs. kontrola: p>0,05 (ns) hiperT vs. kontrola: p<0,05 (s [*])
	hipoT	22	69,08	62,43		
	kontrola	20	68,55	60,66		

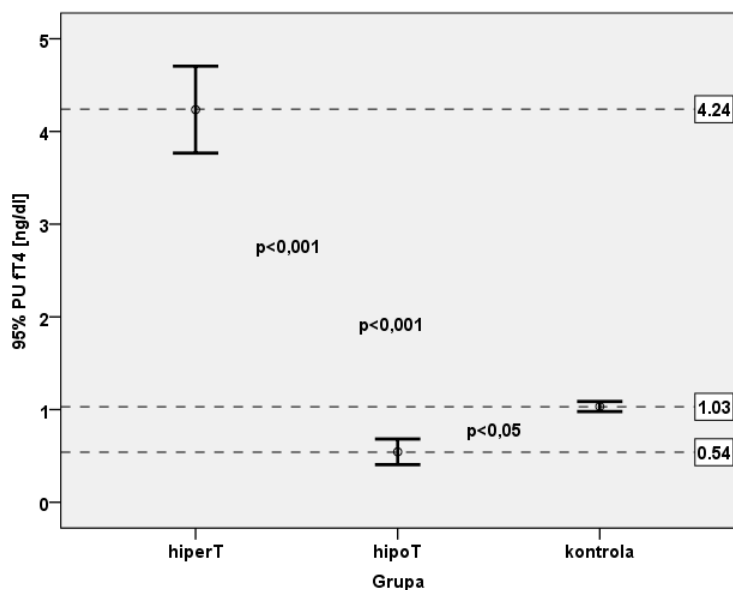
	Grupa	n	Średnia	Mediana	Test / istotność	Test post-hoc (Kruskal-Wallis: test Dunn'a / ANOVA: test Newman'a-Keuls'a)
OPG [pmol/l]	hiperT	22	4,48	4,68	ANOVA / p=0,013 (s*)	hipoT vs. hiperT: p>0,05 (ns) hipoT vs. kontrola: p>0,05 (ns) hiperT vs. kontrola: p<0,01 (s**)
	hipoT	22	3,79	3,77		
	kontrola	20	3,02	3,00		
sRANKL [pmol/l]	hiperT	22	0,39	0,20	K-W / p=0,33 (ns)	
	hipoT	22	0,38	0,23		
	kontrola	20	0,27	0,09		
sFasL [ng/ml]	hiperT	19	0,14	0,14	K-W / p<0,001 (s***)	hipoT vs. hiperT: p<0,05 (s*) hipoT vs. kontrola: p<0,001 (s***) hiperT vs. kontrola: p>0,05 (ns)
	hipoT	11	0,27	0,26		
	kontrola	15	0,09	0,06		

Nie stwierdzono istotnych różnic wieku oraz parametrów stanu odżywienia: BMI, BMI-SDS i wskaźnika Cole'a między grupami z nadczynnością, niedoczynnością tarczycy i kontrolną (kolejno test Kruskal'a-Wallis'a p=0,31, p=0,8, p=0,31 i ANOVA dla wskaźnika Cole'a p=0,15).

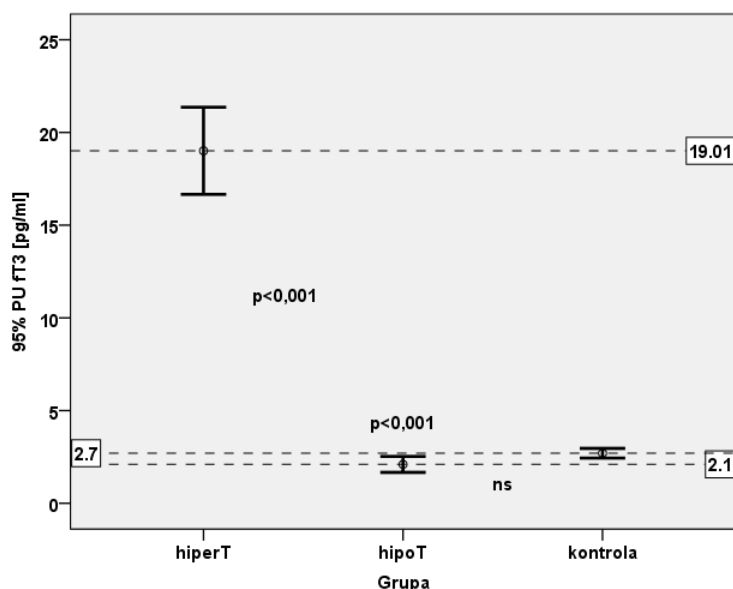
Stwierdzono istotne statystycznie różnice (p<0,001) wszystkich parametrów hormonalnych: TSH, FT4, FT3 i wykładników immunologicznych: TRAb, ATG i ATPO między badanymi grupami. Wszystkie z powyższych obserwowanych różnic są bezpośrednio związane z przeciwstawnymi, ekstremalnymi stanami hormonalnymi nadczynności i niedoczynności tarczycy w porównaniu do grupy kontrolnej i potwierdzają prawidłowy dobór pacjentów do grup badanych. Obserwowane różnice przedstawiono na Wykresach (54-59).



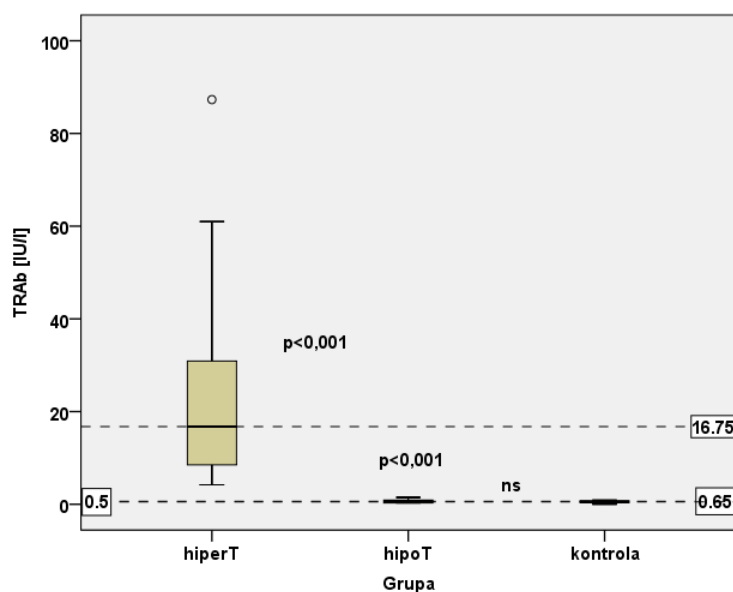
Wykres 54. Różnice stężenia TSH między badanymi grupami (test Dunn'a: hipoT vs. hiperT: p<0,001 / s***), hipoT vs. kontrola: p<0,001 / s***), hiperT vs. kontrola: p<0,001 / s***)



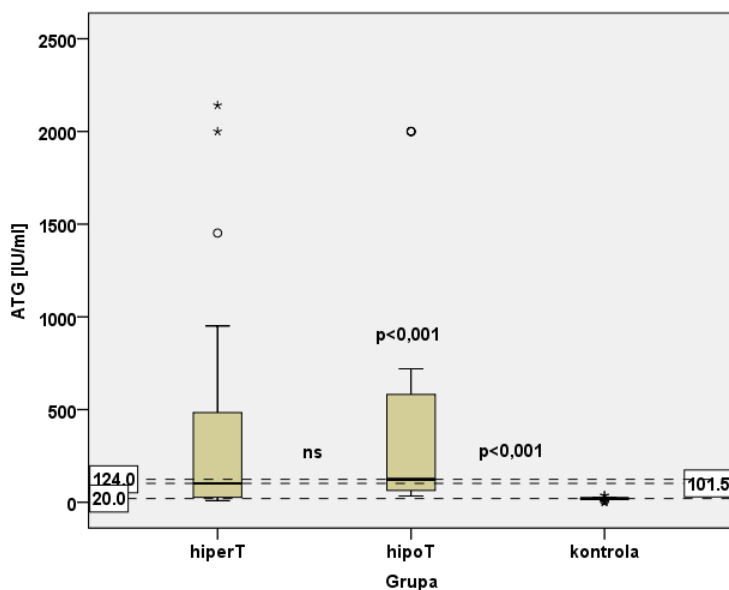
Wykres 55. Różnice stężenia FT4 między badanymi grupami (test Newman'a-Keuls'a:
hipoT vs. hiperT: $p < 0,001$ / s***,
hipoT vs. kontrola: $p < 0,05$ / s*,
hiperT vs. kontrola: $p < 0,001$ / s***)



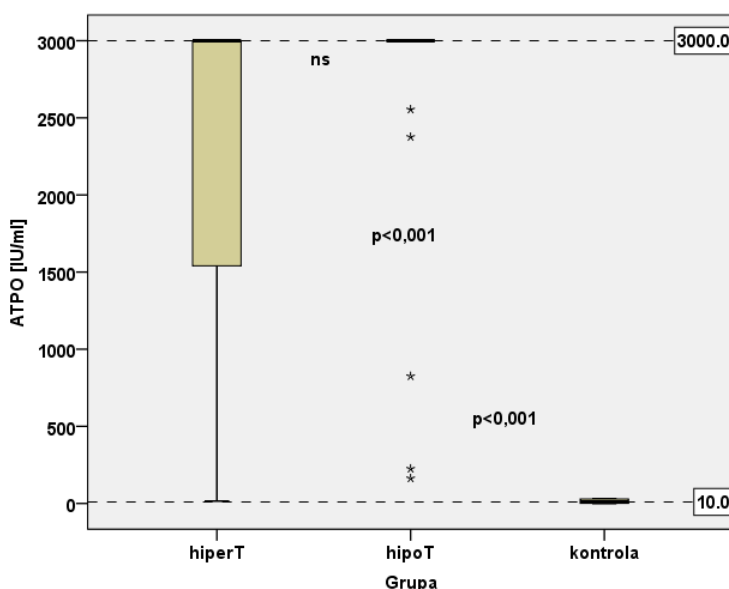
Wykres 56. Różnice stężenia FT3 między badanymi grupami (test Newman'a-Keuls'a:
hipoT vs. hiperT: $p < 0,001$ / s***,
hipoT vs. kontrola: $p > 0,05$ / ns,
hiperT vs. kontrola: $p < 0,001$ / s***)



Wykres 57. Różnice stężenia TRAb między badanymi grupami (test Dunn'a:
hipoT vs. hiperT: $p < 0,001$ / s***,
hipoT vs. kontrola: $p > 0,05$ / ns,
hiperT vs. kontrola: $p < 0,001$ / s***)



Wykres 58. Różnice stężenia ATG między badanymi grupami (test Dunn'a: hipoT vs. hiperT: $p > 0,05$ / ns, hipoT vs. kontrola: $p < 0,001$ / s***, hiperT vs. kontrola: $p < 0,001$ / s***)



Wykres 59. Różnice stężenia ATPO między badanymi grupami (test Dunn'a: hipoT vs. hiperT: $p > 0,05$ / ns, hipoT vs. kontrola: $p < 0,001$ / s***, hiperT vs. kontrola: $p < 0,001$ / s***)

Stężenie TSH w grupie z niedoczynnością tarczycy (mediana 37,34 $\mu\text{IU/ml}$) było wyższe i różniło się bardzo istotnie statystycznie od stężenia TSH w grupie z nadczynnością tarczycy (mediana 0 $\mu\text{IU/ml}$; $p < 0,001$) oraz od stężenia TSH w grupie kontrolnej (mediana 2,42 $\mu\text{IU/ml}$; $p < 0,001$). Stężenie TSH w grupie kontrolnej i z nadczynnością tarczycy również różniło się w bardzo istotny sposób pomiędzy obiema grupami ($p < 0,001$) (Wykres 54).

Analizując stężenie fT4 w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy stwierdzono wyższe stężenie fT4 (średnia 4,24 ng/dl), niż w grupie kontrolnej (średnia 1,03 ng/dl; $p < 0,001$) i grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy (średnia 0,54 ng/dl; $p < 0,001$). Różnice te były bardzo istotne statystycznie. Podobnie stężenie fT4 pomiędzy grupą kontrolną a grupą dzieci z niedoczynnością tarczycy różniło się w istotny sposób ($p < 0,05$) (Wykres 55).

Najwyższe stężenie fT3 stwierdzono w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy (średnia 19,01 pg/ml), było wyższe i różniło się bardzo istotnie statystycznie od stężenia w grupach: z niedoczynnością tarczycy (średnia 2,1 pg/ml; $p < 0,001$) i kontrolnej (średnia 2,7 pg/ml; $p < 0,001$). Natomiast stężenie fT3 w grupie z niedoczynnością tarczycy nie różniło się istotnie od stężenia w grupie kontrolnej ($p > 0,05$) (Wykres 56).

Stężenie TRAb w grupie z nadczynnością tarczycy (mediana 16,75 IU/l) było bardzo wysokie i znamienne statystycznie wyższe w porównaniu ze stężeniem w grupie z niedoczynnością tarczycy (mediana 0,65 IU/l; $p < 0,001$) oraz stężeniem w grupie kontrolnej (mediana 0,5 IU/l; $p < 0,001$). Nie stwierdzono istotnych różnic między stężeniem TRAb w grupie z niedoczynnością tarczycy i kontrolnej ($p > 0,05$) (Wykres 57).

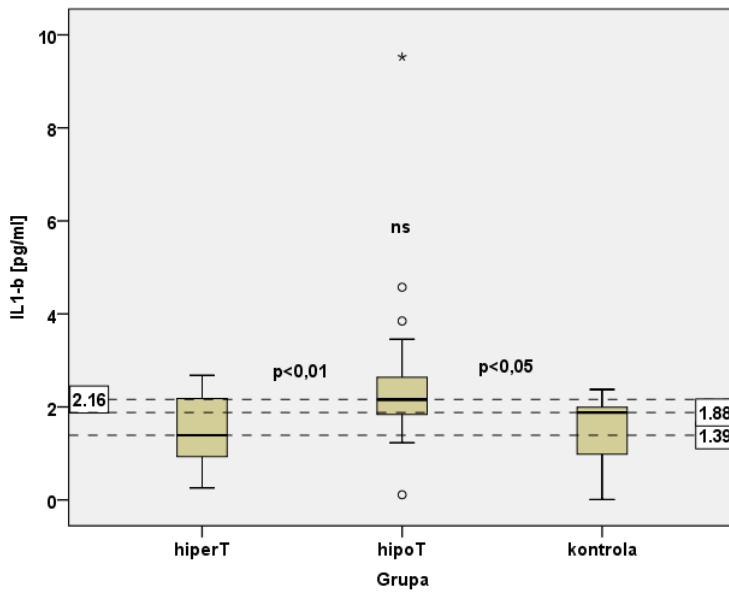
Najwyższe stężenie ATG stwierdzono w grupie z niedoczynnością tarczycy (mediana 124 IU/ml), było ono istotnie wyższe niż stężenie ATG w grupie kontrolnej (mediana 20 IU/ml; $p < 0,001$). Stężenie ATG w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy (mediana 101,5 IU/ml) było również istotnie wyższe niż stężenie w grupie kontrolnej ($p < 0,001$). Nie stwierdzono istotnych różnic stężenia ATG między grupami z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy ($p > 0,05$) (Wykres 58).

Stężenie ATPO w grupach z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy (w obu grupach mediana stężenia ATPO wyniosła 3000 IU/ml) było wysoce istotne statystycznie wyższe od stężenia ATPO w grupie kontrolnej (mediana 10 IU/ml; $p < 0,001$ dla obu różnic). Stężenie ATPO w grupach z nadczynnością i niedoczynnością nie różniło się istotnie między sobą ($p > 0,05$) (Wykres 59).

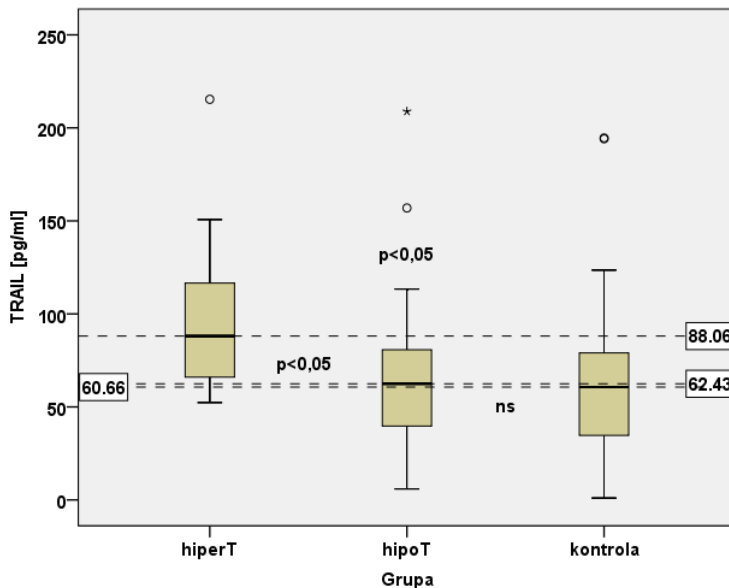
Poddano analizie stężenie oznaczonych cytokin: IL-6, TNF- α , IL-1 β , TRAIL, OPG, sRANKL i sFasL w grupach dzieci z nadczynnością, niedoczynnością tarczycy i w grupie kontrolnej

Nie stwierdzono istotnych różnic stężeń IL-6, TNF- α i sRANKL między badanymi grupami dzieci (test Kruskal'a-Walis'a; kolejno $p = 0,48$, $p = 0,067$ i $p = 0,33$).

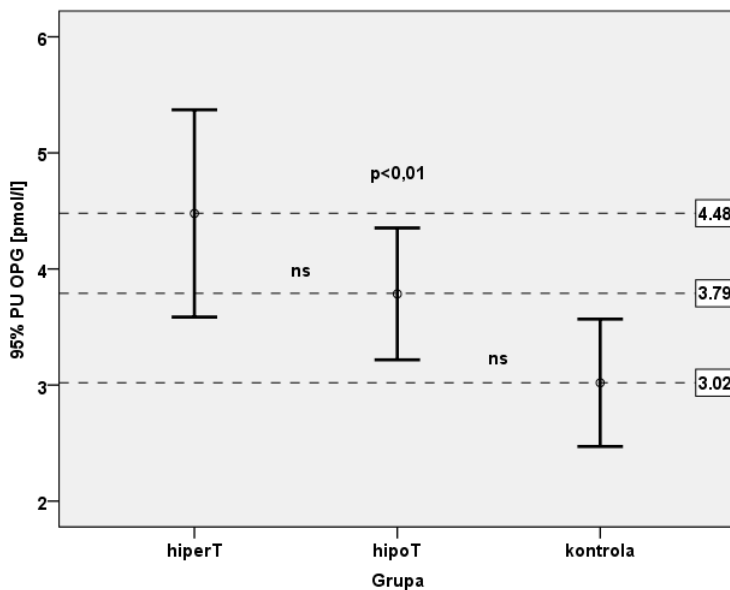
Stwierdzono natomiast bardzo znamienne statystycznie różnice stężenia cytokin: IL-1 β i sFasL (test Kruskal'a-Walis'a; kolejno $p = 0,002$ i $p < 0,001$) oraz istotne różnice stężenia TRAIL (test Kruskal'a-Walis'a; $p = 0,013$) i OPG (ANOVA; $p = 0,013$), pomiędzy badanymi grupami dzieci, co przedstawiono na poniższych Wykresach (60-63).



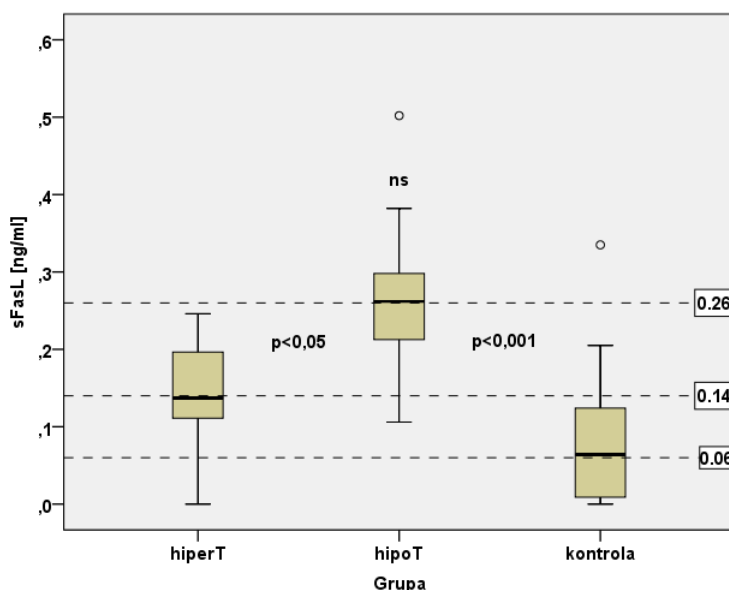
Wykres 60. Różnice stężenia IL-1 β między badanymi grupami (test Dunn'a: hiperT vs. hiperT: p<0,01 / s**, hiperT vs. kontrola: p<0,05 / s*, hiperT vs. kontrola: p>0,05 / ns)



Wykres 61. Różnice stężenia TRAIL między badanymi grupami (test Dunn'a: hiperT vs. hiperT: p<0,05 / s*, hiperT vs. kontrola: p>0,05 / ns, hiperT vs. kontrola: p<0,05 / s*)



Wykres 62. Różnice stężenia OPG między badanymi grupami (test Newman'a-Keuls'a: hiperT vs. hiperT: p>0,05 / ns, hiperT vs. kontrola: p>0,05 / ns, hiperT vs. kontrola: p<0,01 / s**)



Wykres 63. Różnice stężenia sFasL między badanymi grupami (test Dunn'a: hiperT vs. hiperT: $p<0,05$ / s*, hiperT vs. kontrola: $p<0,001$ / s***, hiperT vs. kontrola: $p>0,05$ / ns)

Stwierdzono znamienne statystycznie wyższe stężenie IL-1 β w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy (mediana 2,16 pg/ml) w porównaniu z grupą dzieci z nadczynnością tarczycy (mediana 1,39 pg/ml); ($p<0,01$) i grupą kontrolną (mediana 1,88 pg/ml); ($p<0,05$). Nie stwierdzono istotnej różnicy stężenia IL-1 β między grupą dzieci z nadczynnością tarczycy i kontrolną ($p>0,05$) (Wykres 60).

Zaobserwowano istotnie wyższe stężenie TRAIL w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy (mediana 88,06 pg/ml) w porównaniu z grupą z niedoczynnością tarczycy (mediana 62,43 pg/ml; $p<0,05$) i kontrolną (mediana 60,66 pg/ml; $p<0,05$). Nie stwierdzono istotnej różnicy stężenia TRAIL między grupą z niedoczynnością tarczycy a kontrolną ($p>0,05$) (Wykres 61).

Stwierdzono znamienne statystycznie wyższe stężenie OPG w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy (średnia 4,48 pmol/l) w porównaniu z grupą kontrolną (średnia 3,02 pmol/l; $p<0,01$). Nie stwierdzono istotnych różnic stężenia OPG między grupą dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy (średnia 3,79 pmol/l; $p>0,05$) oraz niedoczynnością tarczycy i kontrolną ($p>0,05$) (Wykres 62).

Zaobserwowano również znamienne statystycznie wyższe stężenie sFasL w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy (mediana 0,26 ng/ml) w porównaniu z grupą kontrolną (mediana 0,06 ng/ml; $p<0,001$) oraz w stosunku do grupy dzieci z nadczynnością tarczycy (mediana 0,14 ng/ml; $p<0,05$). Różnica stężenia sFasL w grupie dzieci z nadczynnością i kontrolnej była nieistotna statystycznie ($p>0,05$) (Wykres 63).

Korelacje badanych parametrów i wykonanych oznaczeń, w grupach dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy oraz w grupie kontrolnej

W każdej z badanych grup (dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy oraz kontrolnej) przeanalizowano korelacje nieparametryczne wybranych parametrów:

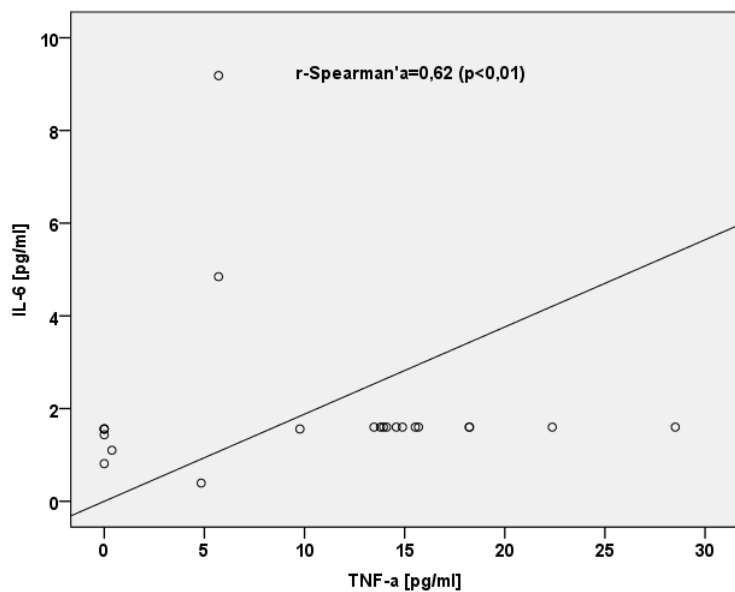
1. Korelacje stężenia badanych cytokin (IL-6, TNF- α , IL-1 β , TRAIL, OPG, sRANKL, sFasL) między sobą w grupach pacjentów
2. Korelacje stężenia badanych cytokin (IL-6, TNF- α , IL-1 β , TRAIL, OPG, sRANKL, sFasL) z wiekiem, parametrami stanu odżywienia (BMI, BMI-SDS, wskaźnik Cole'a) i parametrami hormonalnymi i immunologicznymi (stężenie TSH, fT4, fT3, TRAb, ATG, ATPO).

Podsumowanie korelacji badanych cytokin między sobą w grupach pacjentów przedstawiono w poniższej Tabeli 17.

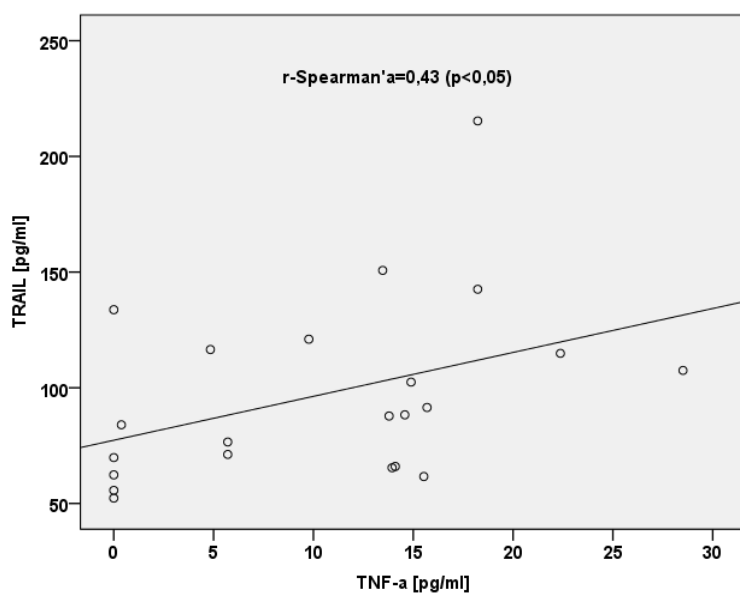
Tabela 17. Korelacje nieparametryczne r-Spearman'a i ich istotność – badane cytokiny w grupach: dzieci z nadczynnością tarczycy – kolor czerwony, dzieci z niedoczynnością tarczycy – kolor żółty, grupa kontrolna – kolor zielony (p<0,05 oznaczono * / p<0,01 oznaczono **)

		IL-6 [pg/ml]	TNF- α [pg/ml]	IL1- β [pg/ml]	TRAIL [pg/ml]	OPG [pmol/l]	sRANKL [pmol/l]
TNF- α [pg/ml]	r	0,62					
	p	**					
IL-1 β [pg/ml]	r	ns	0,45	-0,58			
	p	ns	*	**			
TRAIL [pg/ml]	r	ns	0,43	ns			
	p	ns	*	ns			
OPG [pmol/l]	r	0,51	0,69	0,44	0,54		
	p	*	**	*	**		
sRANKL [pmol/l]	r	ns	0,67	ns	0,53	0,54	
	p	ns	**	ns	*	**	
sFasL [ng/ml]	r	ns	0,54	ns	ns	0,72	0,61
	p	ns	*	ns	ns	*	**
		hiperT - czerwony		hipoT - żółty		kontrola - zielony	

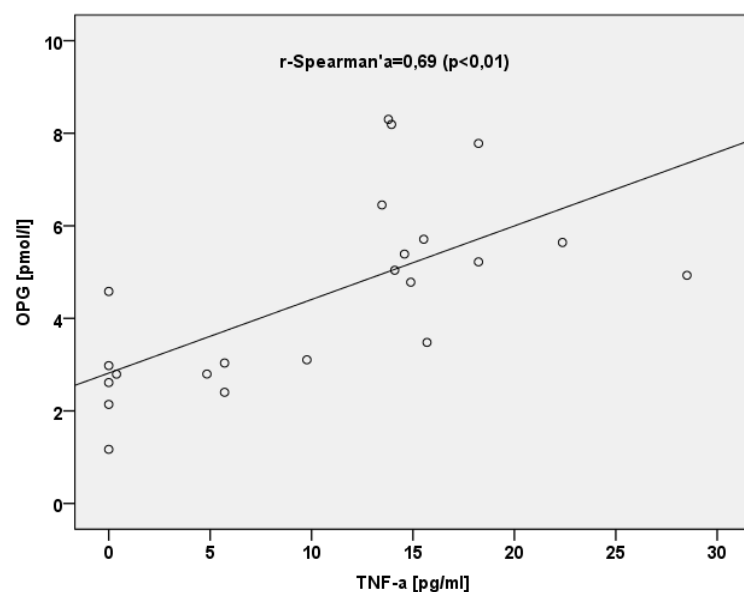
Poszczególne korelacje badanych cytokin w grupie dzieci z **nadczynnością** tarczycy (Tabela 17: kolor czerwony) przedstawiono na poniższych Wykresach (64-70)



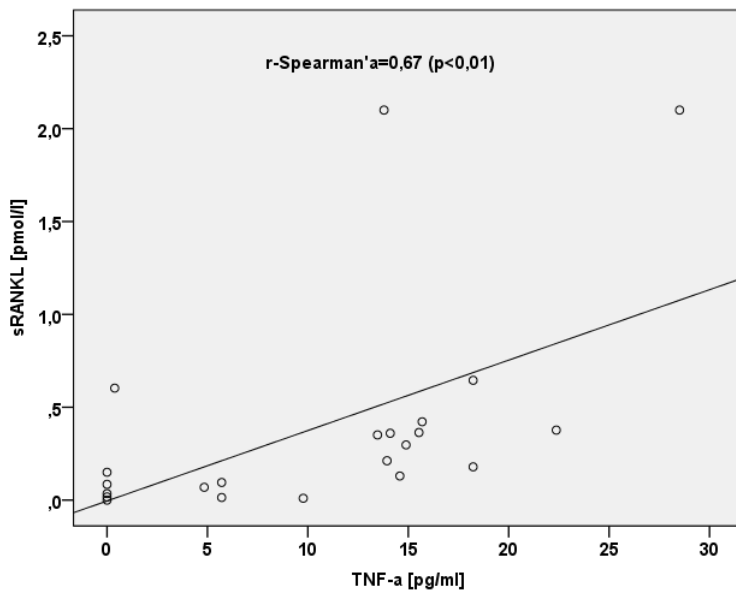
Wykres 64. Dodatnia korelacja nieparametryczna IL-6 i TNF- α w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy $r\text{-Spearman}'a=0,62 (p<0,01)$



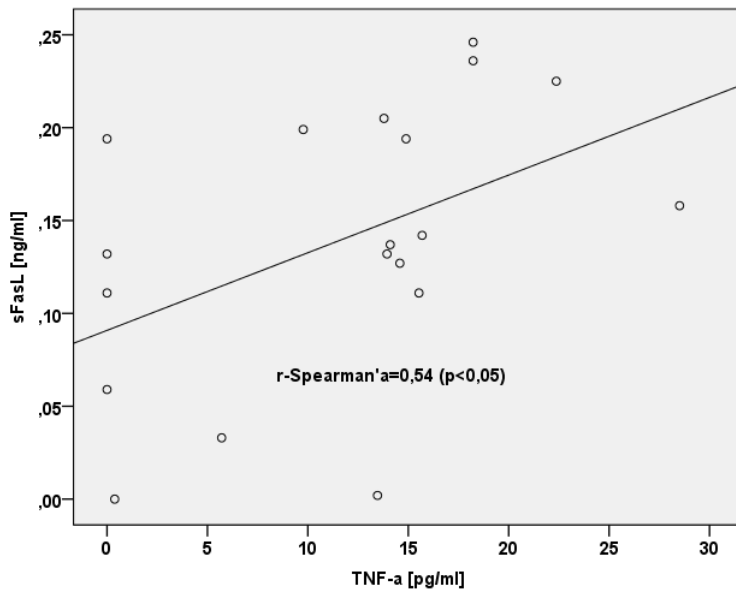
Wykres 65. Dodatnia korelacja nieparametryczna TRAIL i TNF- α w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy $r\text{-Spearman}'a=0,43 (p<0,05)$



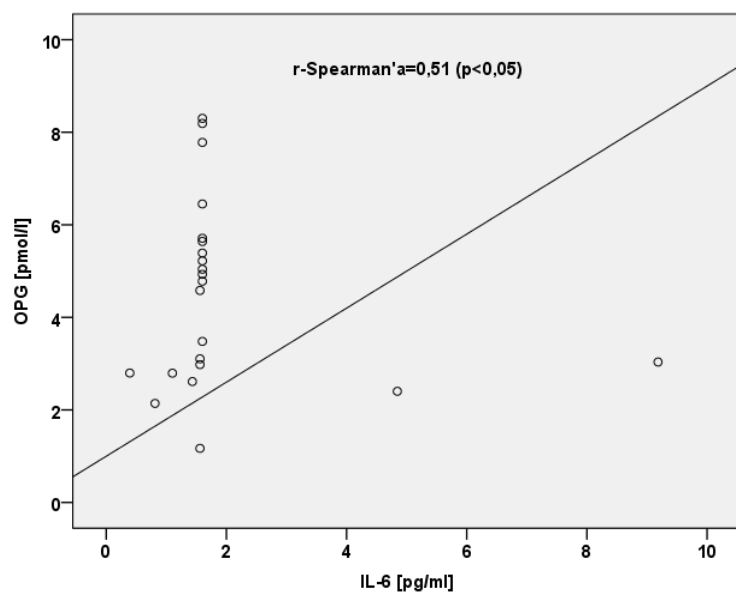
Wykres 66. Dodatnia korelacja nieparametryczna OPG i TNF- α w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy $r\text{-Spearman}'a=0,69 (p<0,01)$



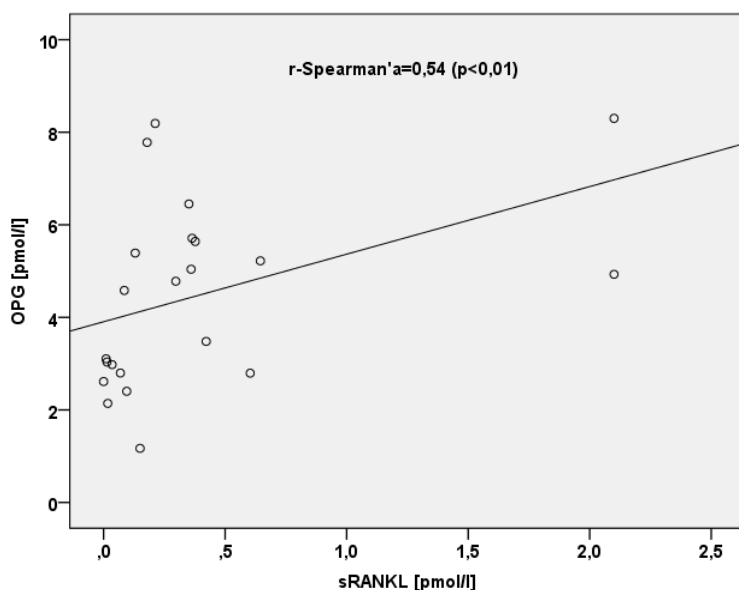
Wykres 67. Dodatnia korelacja nieparametryczna sRANKL i TNF- α w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy r-Spearman'a=0,67 ($p<0,01$)



Wykres 68. Dodatnia korelacja nieparametryczna sFasL i TNF- α w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy r-Spearman'a=0,54 ($p<0,05$)



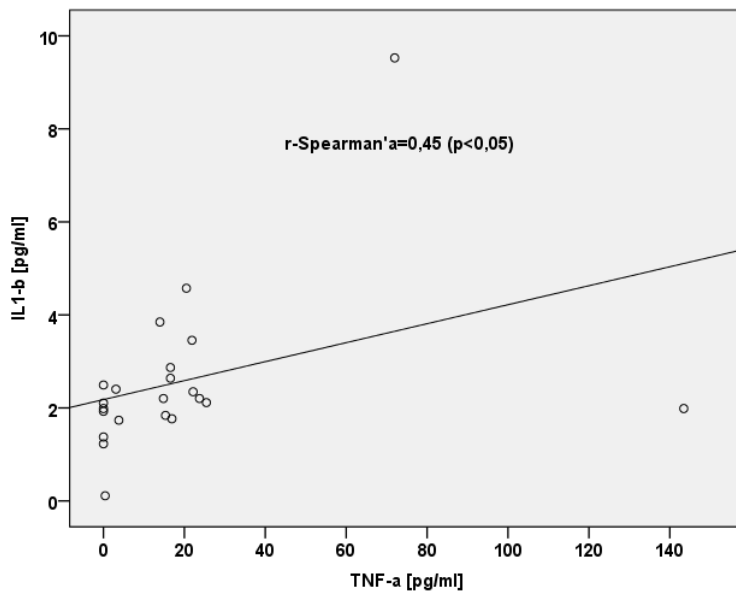
Wykres 69. Dodatnia korelacja nieparametryczna OPG i IL-6 w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy r-Spearman'a=0,51 ($p<0,05$)



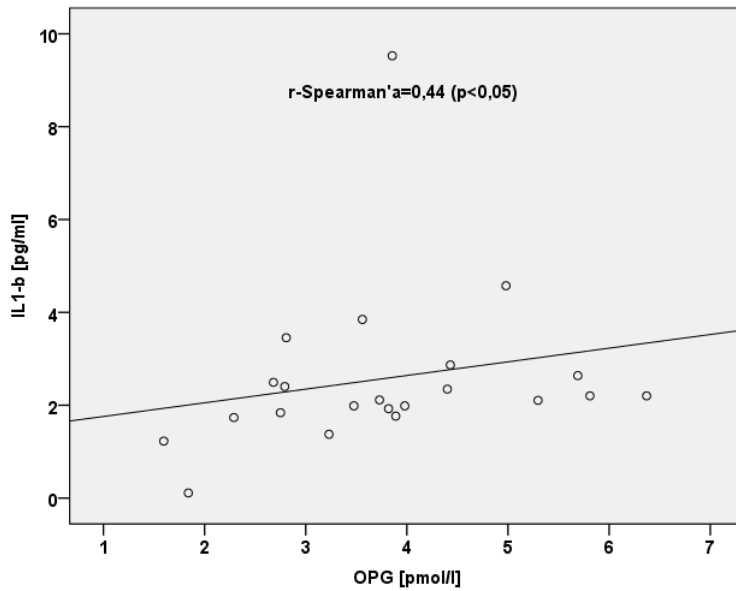
Wykres 70. Dodatnia korelacja nieparametryczna OPG i sRANKL w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy $r\text{-Spearman}'a=0,54 (p<0,01)$

Stwierdzono następujące istotne, dodatnie korelacje nieparametryczne: IL-6 i TNF- α ($r=0,62$; $p<0,01$), TRAIL i TNF- α ($r=0,43$; $p<0,05$), OPG i TNF- α ($r=0,69$; $p<0,01$), sRANKL i TNF- α ($r=0,67$; $p<0,01$), sFasL i TNF- α ($r=0,54$; $p<0,05$), OPG i IL-6 ($r=0,51$; $p<0,05$), OPG i sRANKL ($r=0,54$; $p<0,01$). Zwraca uwagę fakt, że wszystkie stwierdzone istotne korelacje są dodatnie, co sugeruje ich synergistyczne działanie w nadczynności tarczycy – jednoczesny wzrost ich stężeń. Powyższy profil korelacji cytokin jest specyficzny dla grupy badanych dzieci z nadczynnością tarczycy – żadnej z siedmiu powyższych istotnych korelacji nie stwierdzono w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy ani w grupie kontrolnej.

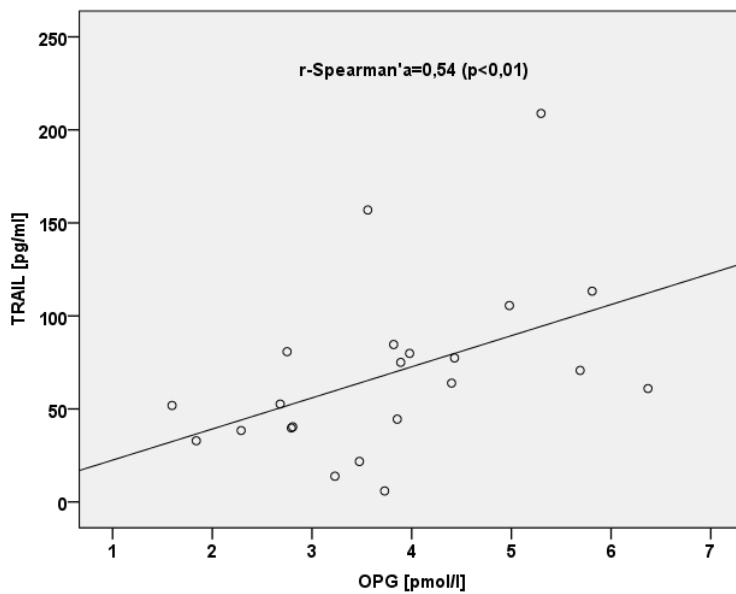
Zaobserwowane korelacje badanych cytokin w grupie dzieci z **niedoczynnością** tarczycy (Tabela 17: kolor żółty) przedstawiono na poniższych Wykresach (71-75).



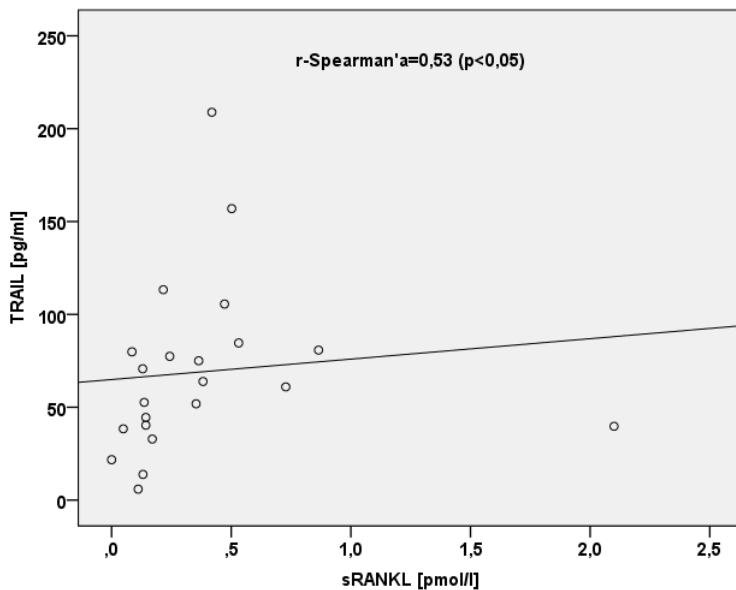
Wykres 71. Dodatnia korelacja nieparametryczna IL-1β i TNF-α w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy $r\text{-Spearman}'a=0,45 (p<0,05)$



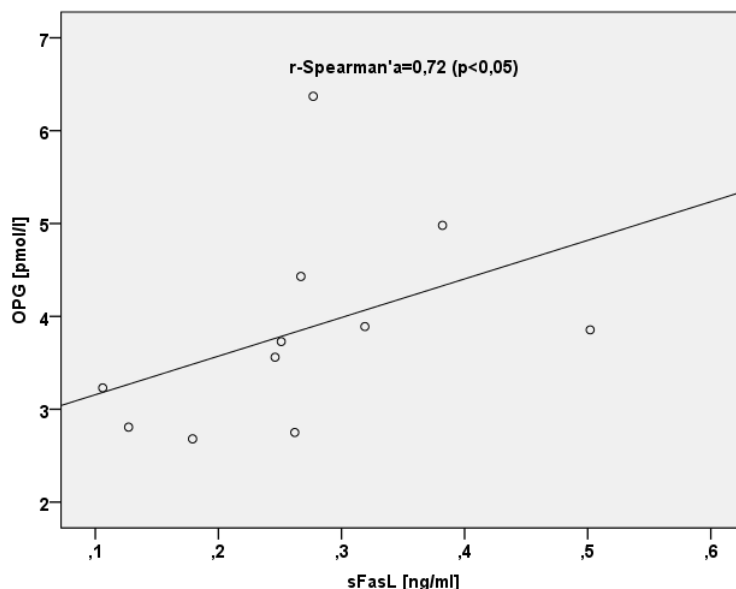
Wykres 72. Dodatnia korelacja nieparametryczna IL-1β i OPG w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy $r\text{-Spearman}'a=0,44 (p<0,05)$



Wykres 73. Dodatnia korelacja nieparametryczna TRAIL i OPG w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy $r\text{-Spearman}'a=0,54 (p<0,01)$



Wykres 74. Dodatnia korelacja nieparametryczna TRAIL i sRANKL w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy $r\text{-Spearman}'a=0,53$ ($p<0,05$)

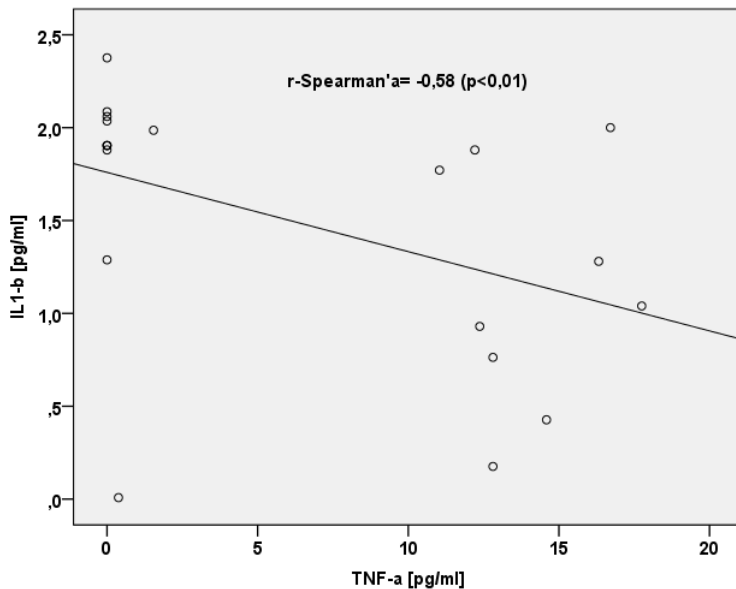


Wykres 75. Dodatnia korelacja nieparametryczna OPG i sFasL w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy $r\text{-Spearman}'a=0,72$ ($p<0,05$)

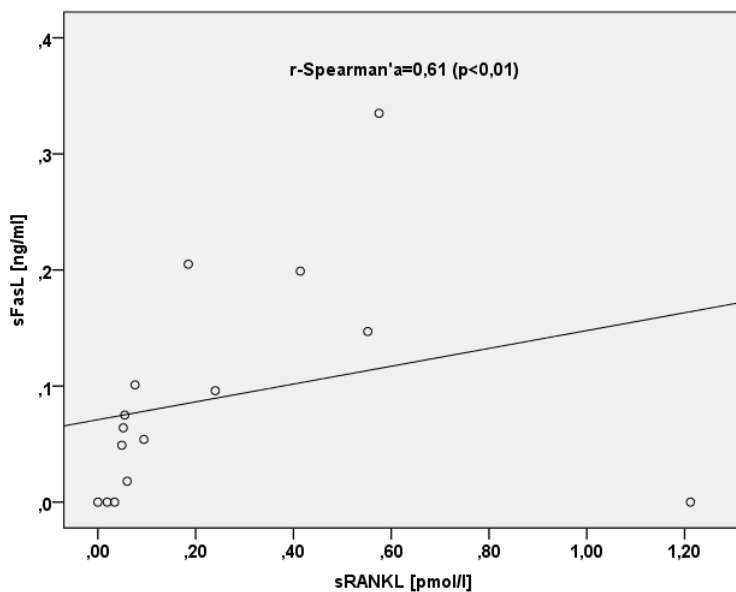
Stwierdzono następujące istotne, dodatnie korelacje nieparametryczne w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy: IL-1 β i TNF- α ($r=0,45$; $p<0,05$), IL-1 β i OPG ($r=0,44$; $p<0,05$), OPG i TRAIL ($r=0,54$; $p<0,01$), sRANKL i TRAIL ($r=0,53$; $p<0,05$), OPG i sFasL ($r=0,72$; $p<0,05$). Podobnie jak w grupie z nadczynnością tarczycy stwierdzono dodatnie korelacje, co sugeruje synergistyczne działania ww. cytokin w niedoczynności tarczycy – ich jednoczesny wzrost stężenia, jednak obserwowany profil korelacji jest całkowicie inny – nie stwierdzono żadnej wspólnej, istotnej korelacji w obu przeciwstawnych klinicznie grupach pacjentów.

Korelacja IL-1 β i TNF- α obserwowana w grupie **kontrolnej** jest również istotna, ma natomiast przeciwny, ujemny charakter ($r=-0,58$; $p<0,01$), odwrotnie niż w grupie z niedoczynnością tarczycy – wraz ze wzrostem stężenia IL-1 β maleje stężenie TNF- α .

W obu grupach obserwowana zależność jest istotna, jednak w niedoczynności tarczycy obserwuje się odwrócenie zależności w porównaniu do grupy kontrolnej (korelacja ujemna -> dodatnia). Ponadto w grupie kontrolnej stwierdzono również dodatnią zależność sFasL i sRANKL ($r=0,61$; $p<0,01$). Obie istotne zależności przedstawiono na poniższych Wykresach (76 i 77).



Wykres 76. Ujemna korelacja nieparametryczna IL-1 β i TNF- α w grupie kontrolnej r -Spearman'a= -0,58 ($p<0,01$)



Wykres 77. Dodatnia korelacja nieparametryczna sFasL i sRANKL w grupie kontrolnej r -Spearman'a=0,61 ($p<0,01$)

Poza zmianą charakteru istotnej korelacji IL-1 β i TNF- α w grupie kontrolnej nie ujawniono innych istotnych korelacji stwierdzanych w grupach dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy, co potwierdza obserwację, że stwierdzone korelacje są

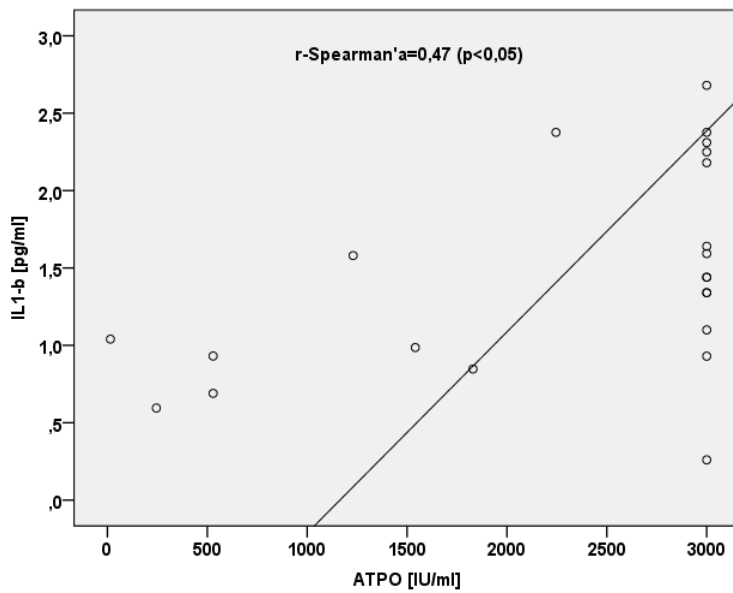
charakterystyczne dla stanów patologicznych nadczynności i niedoczynności tarczycy, a ponadto ich profil pozwala różnicować te stany między sobą oraz z grupą kontrolną.

Przeanalizowano również korelacje stężenia badanych cytokin (IL-6, TNF- α , IL-1 β , TRAIL, OPG, sRANK i sFasL) z wiekiem, stanem odżywienia (BMI, BMI-SDS, wskaźnik Cole'a) oraz parametrami hormonalnej i immunologicznej funkcji tarczycy (stężenie TSH, fT4, fT3, TRAb, ATG i ATPO). Wyniki podsumowano w poniższej Tabeli 18.

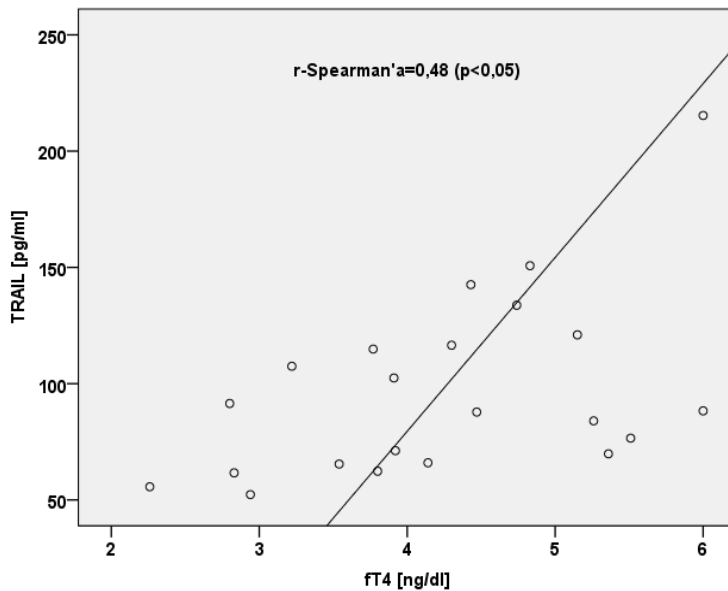
Tabela 18. Korelacje nieparametryczne r-Spearman'a i ich istotność – parametry stanu odżywienia, tyreometaboliczne i badane cytokiny w grupach: dzieci z nadczynnością tarczycy – kolor czerwony, dzieci z niedoczynnością tarczycy – kolor żółty, grupa kontrolna – kolor zielony (p<0,05 oznaczono * / p<0,01 oznaczono **)

		IL-6 [pg/ml]	TNF- α [pg/ml]	IL1- β [pg/ml]	TRAIL [pg/ml]		OPG [pmol/l]	sRANKL [pmol/l]	sFasL [ng/ml]
Wiek [lata]	r	ns	ns	ns	ns		ns	0,47	ns
	p							*	
BMI [kg/m ²]	r	ns	ns	ns	ns		ns	ns	ns
	p								
BMI SDS	r	ns	ns	ns	ns		ns	ns	0,46
	p								*
w.Cole'a [bezwgl.]	r	ns	ns	ns	ns		ns	ns	ns
	p								
TSH [μ IU/ml]	r	ns	ns	ns	ns		ns	-0,51	ns
	p							*	
fT4 [ng/dl]	r	ns	ns	ns	0,48	0,44	ns	0,53	ns
	p				*	*		*	
fT3 [pg/ml]	r	ns	ns	ns	0,49		ns	0,52	ns
	p				*			*	
TRAb [IU/l]	r	ns	ns	ns	0,50		ns	ns	ns
	p				*				
ATG [IU/ml]	r	ns	ns	ns	ns		ns	ns	ns
	p								
ATPO [IU/ml]	r	ns	0,54	0,47	-0,50		ns	0,46	ns
	p		**	*	*			*	
hiperT - czerwony			hipoT - żółty			kontrola - zielony			

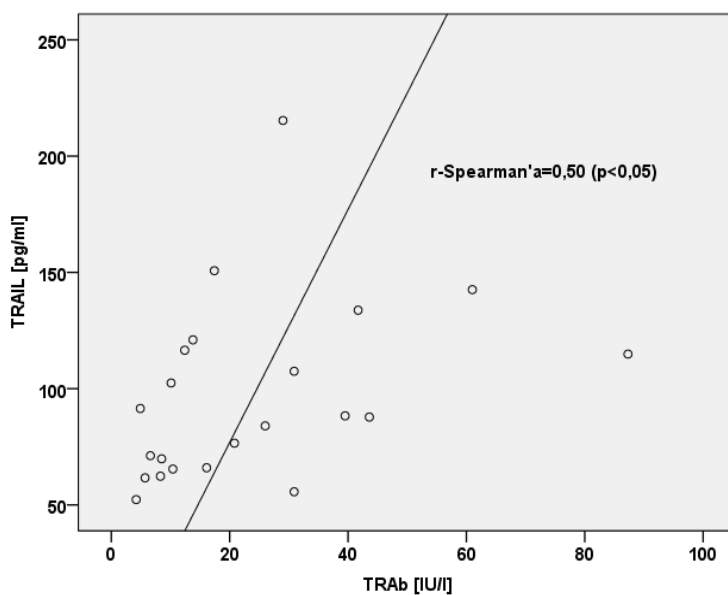
Istotne statystycznie korelacje w grupie dzieci z **nadczynnością** tarczycy przedstawiono szczegółowo na poniższych Wykresach (78-82).



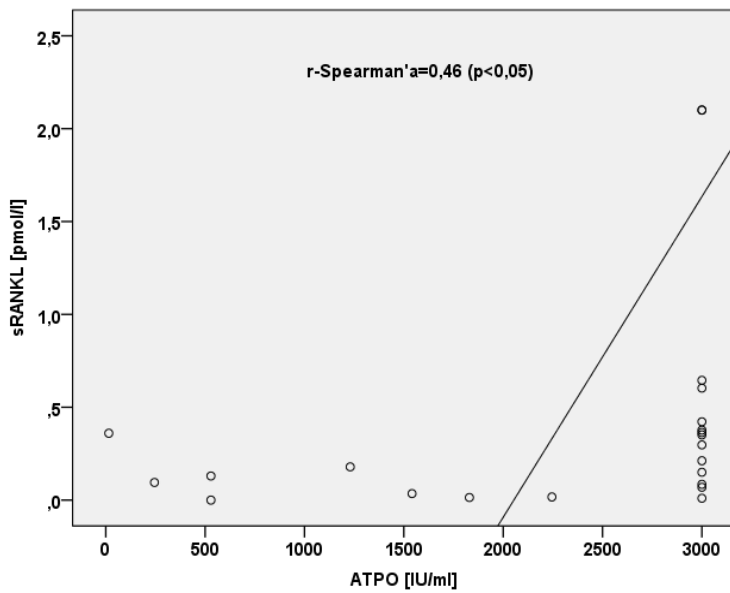
Wykres 78. Dodatnia korelacja nieparametryczna IL-1 β i ATPO w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy $r\text{-Spearman}'a=0,47$ ($p<0,05$)



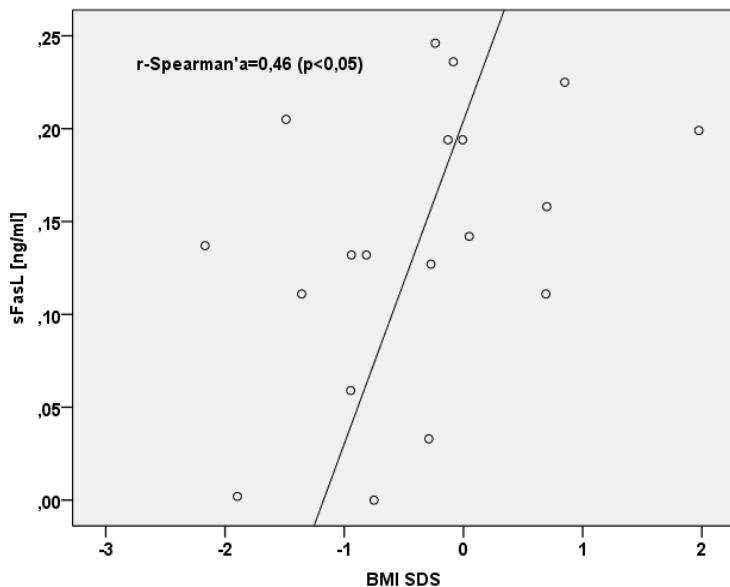
Wykres 79. Dodatnia korelacja nieparametryczna TRAIL i fT4 w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy $r\text{-Spearman}'a=0,48$ ($p<0,05$)



Wykres 80. Dodatnia korelacja nieparametryczna TRAIL i TRAb w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy $r\text{-Spearman}'a=0,50$ ($p<0,01$)



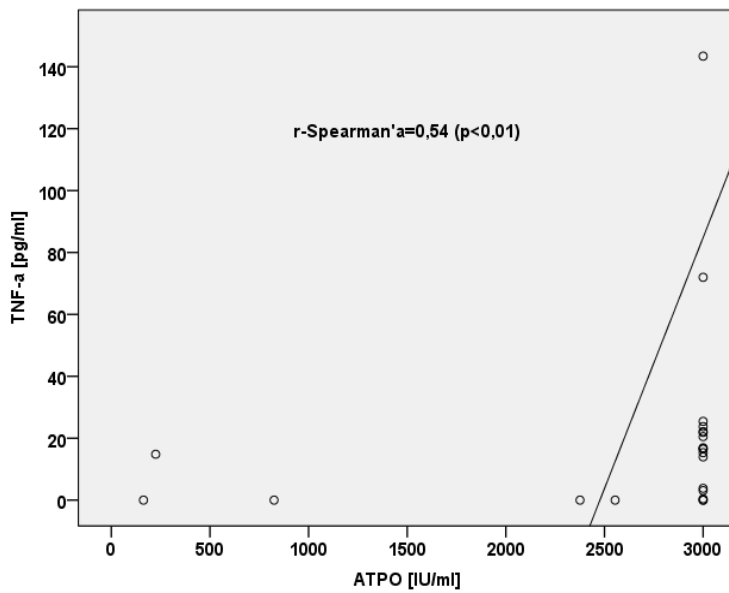
Wykres 81. Dodatnia korelacja nieparametryczna sRANKL i ATPO w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy $r\text{-Spearman}'a=0,46$ ($p<0,05$)



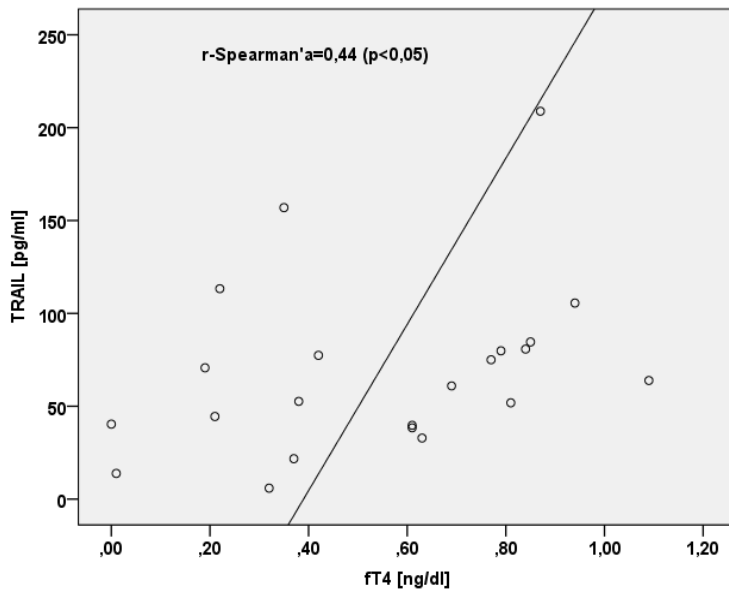
Wykres 82. Dodatnia korelacja nieparametryczna sFasL i BMI SDS w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy $r\text{-Spearman}'a=0,46$ ($p<0,05$)

W grupie dzieci z **nadczynnością** tarczycy stwierdzono następujące istotne korelacje: IL- β i ATPO ($r=0,47$; $p<0,05$), TRAIL i fT4 ($r=0,48$; $p<0,05$), TRAIL i TRAb ($r=0,50$; $p<0,01$), sRANKL i ATPO ($r=0,46$; $p<0,05$) oraz sFasL i BMI-SDS ($r=0,46$; $p<0,05$). W grupach dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy stwierdzono tylko jedną, wspólną istotną, dodatnią korelację: TRAIL i fT4 (w grupie z niedoczynnością tarczycy $r=0,44$, $p<0,05$). Poza tym profile korelacji różniły się i były specyficzne dla wszystkich trzech badanych grup.

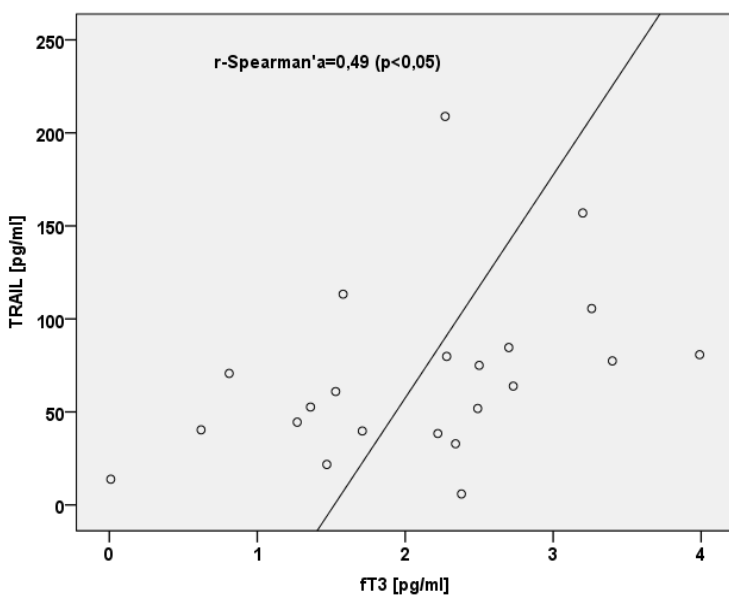
Istotne korelacje w grupie dzieci z **niedoczynnością** tarczycy przedstawiono szczegółowo na poniższych Wykresach (83-88).



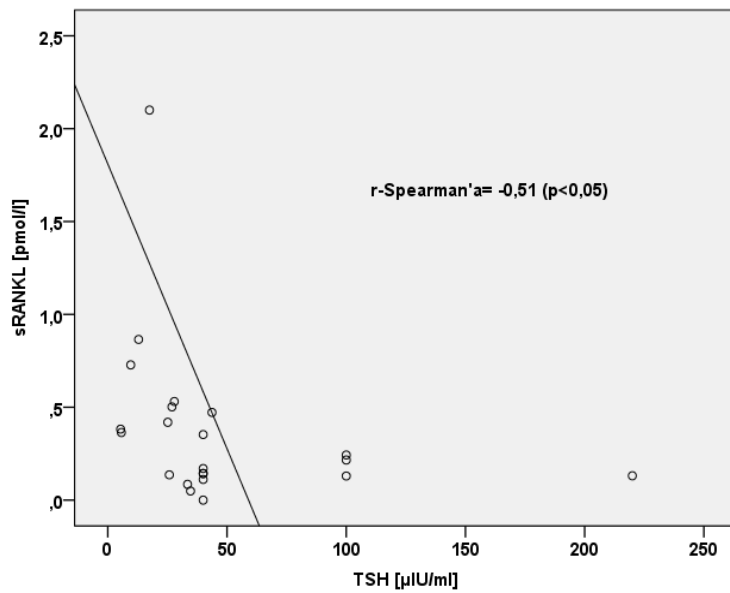
Wykres 83. Dodatnia korelacja nieparametryczna TNF-α i ATPO w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy r-Spearman'a=0,54 (p<0,01)



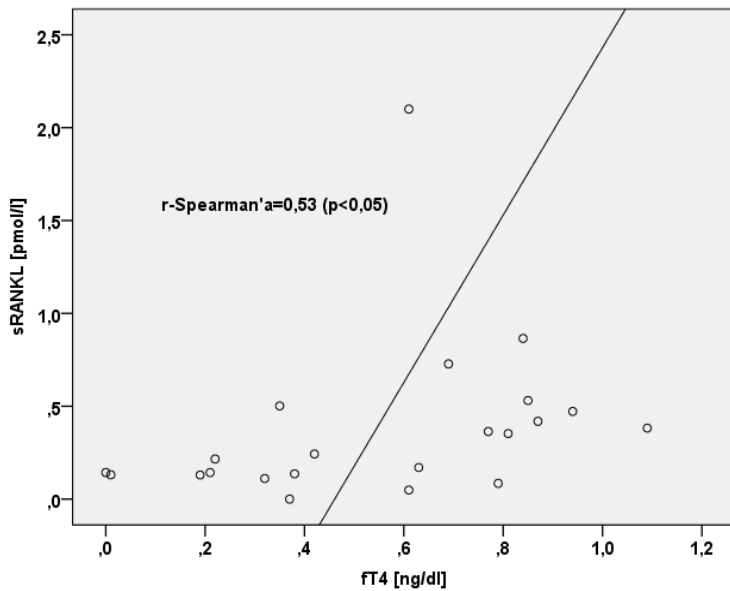
Wykres 84. Dodatnia korelacja nieparametryczna TRAIL i fT4 w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy r-Spearman'a=0,44 (p<0,05)



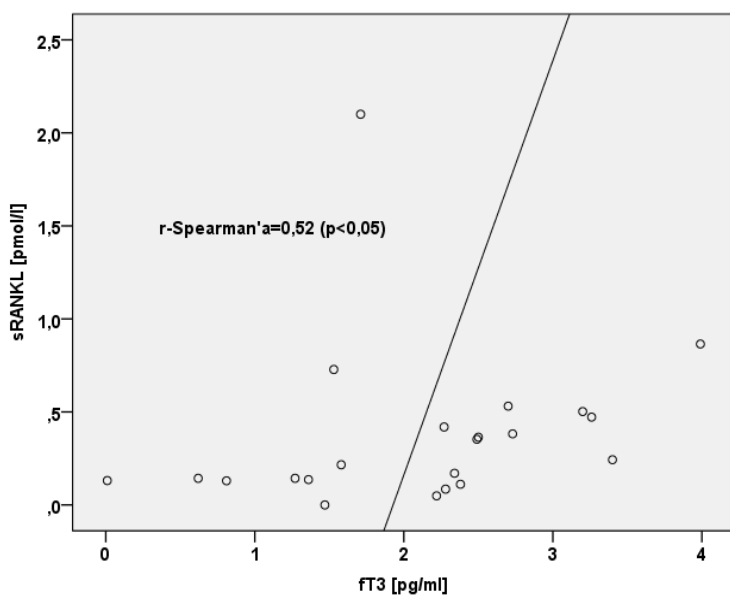
Wykres 85. Dodatnia korelacja nieparametryczna TRAIL i fT3 w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy r-Spearman'a=0,49 (p<0,05)



Wykres 86. Ujemna korelacja nieparametryczna sRANKL i TSH w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy r-Spearman'a= -0,51 (p<0,05)



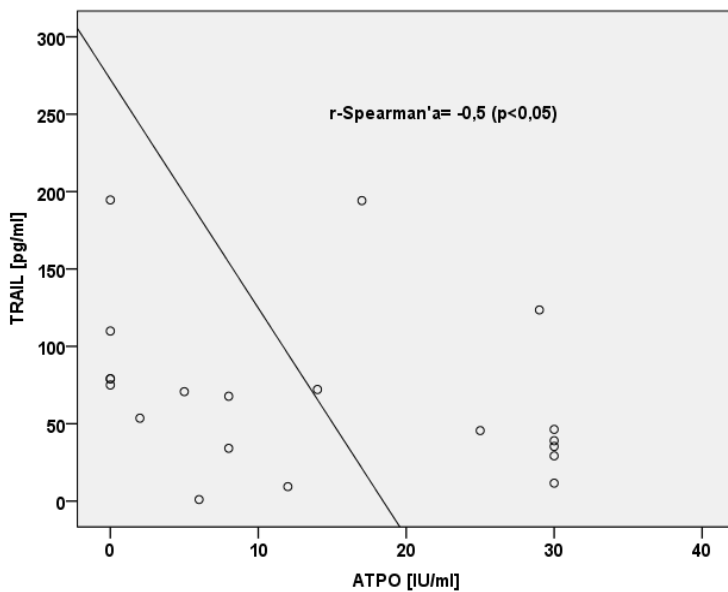
Wykres 87. Dodatnia korelacja nieparametryczna sRANKL i fT4 w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy r-Spearman'a=0,53 (p<0,05)



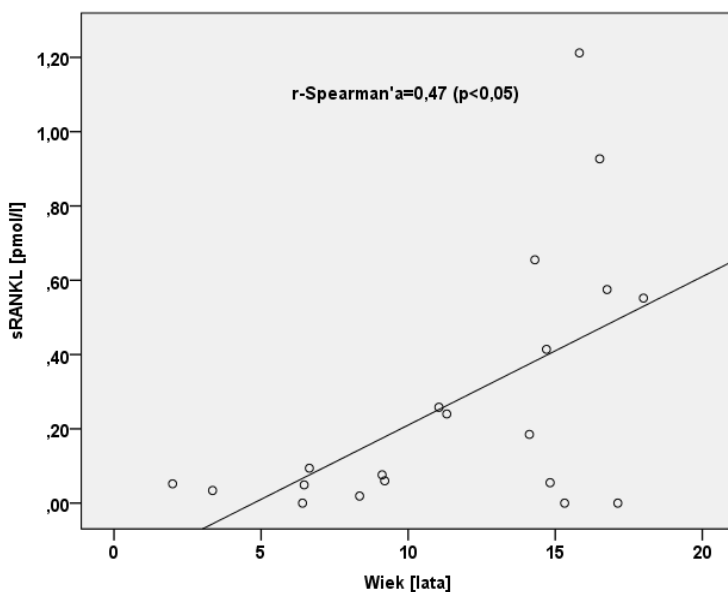
Wykres 88. Dodatnia korelacja nieparametryczna sRANKL i fT3 w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy r-Spearman'a=0,52 (p<0,05)

W grupie dzieci z **niedoczynnością** tarczycy stwierdzono następujące, istotne korelacje: TNF- α i ATPO ($r=0,54$; $p<0,01$), TRAIL i fT4 ($r=0,44$; $p<0,05$), TRAIL i fT3 ($r=0,49$; $p<0,05$), sRANKL i TSH ($r=-0,51$; $p<0,05$), sRANKL i fT4 ($r=0,53$; $p<0,05$) oraz sRANKL i fT3 ($r=0,52$; $p<0,05$). Jak wspomniano powyżej, poza dodatnią korelacją TRAIL i fT4 profil obserwowanych korelacji był specyficzny dla grupy dzieci z niedoczynnością tarczycy – podobnych istotnych korelacji nie stwierdzono w pozostałych grupach.

W grupie **kontrolnej** stwierdzono dwie istotne korelacje: ujemną TRAIL i ATPO ($r=-0,5$; $p<0,05$) i dodatnią korelację sRANKL i wieku pacjentów ($r=0,47$; $p<0,05$), co przedstawiono na poniższych Wykresach (89-90).



Wykres 89. Ujemna korelacja nieparametryczna TRAIL i ATPO w grupie kontrolnej $r\text{-Spearman}'a=-0,5$ ($p<0,05$)



Wykres 90. Dodatnia korelacja nieparametryczna sRANKL i wieku pacjentów w grupie kontrolnej $r\text{-Spearman}'a=0,47$ ($p<0,05$)

Stwierdzone istotne korelacje w grupie kontrolnej nie powtórzyły się w dwóch pozostałych grupach badanych, co pozwala stwierdzić, że są one również specyficzne dla tej grupy i ściśle powiązane jedynie z stanem prawidłowej czynności tarczycy.

4.3. Analiza krzywych ROC

Metoda krzywych ROC służy do oceny przydatności badania (w przypadku niniejszej pracy - stężenia cytokin) jako markera stanu patologicznego. Umożliwia wyznaczenie pola powierzchni pod krzywą (AUC), czyli wartości asymptotycznie dążącej do jedności dla hipotetycznego badania o stuprocentowej czułości i swoistości, a także punktu odcięcia (cut-off), który dyskryminuje grupy badaną i kontrolną z maksymalną czułością i swoistością. Dla badanych cytokin obliczono pole powierzchni pod krzywą ROC (AUC), jego przedział ufności oraz istotność różnicy danego pola powierzchni pod krzywą od 0,5, czyli wartości charakterystycznej całkowicie losowego testu diagnostycznego (brak dyskryminacji grup, czułość i swoistość rzutu monetą).

W pracy wykorzystano metodę krzywych ROC do identyfikacji cytokin, których stężenie będzie w największym stopniu pozwalało różnicować grupy:

1. dzieci z nadczynnością tarczycy i grupę kontrolną
2. dzieci z niedoczynnością tarczycy i grupę kontrolną
3. dzieci z nadczynnością tarczycy i niedoczynnością tarczycy

Współrzędne punktu odcięcia, odpowiadające punktowi krzywej o maksymalnej wartości sumy czułości i swoistości wyznaczono przy pomocy statystyki J-Youden'a według wzoru:

$$J \text{ Youden'a} = \max(\text{czułość} + \text{swoistość})$$

Krzywe ROC: różnicowanie dzieci z nadczynnością tarczycy z grupą kontrolną

W analizie przyjęto następujące założenia:

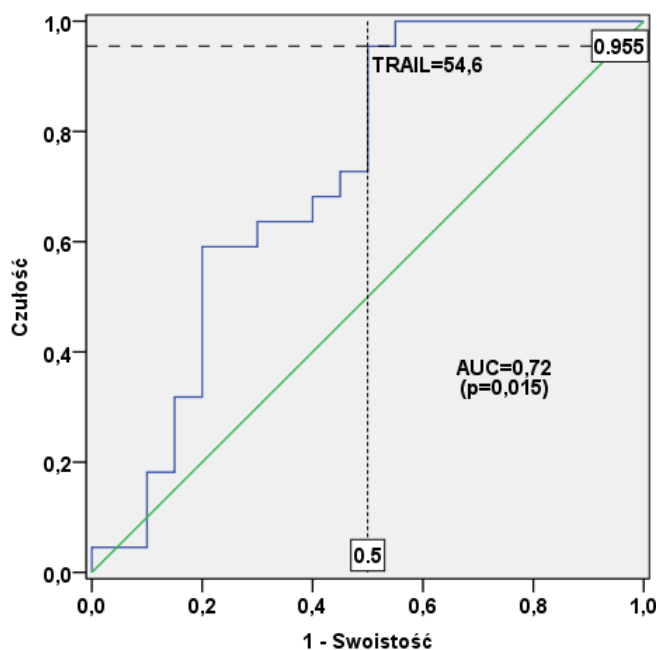
1. Dodatnia wartość zmiennej stanu: przynależność do grupy z nadczynnością tarczycy; grupa kontrolna: zdrowa kontrola
2. Wyższe wyniki wskazują na test bardziej dodatni dla cytokin: IL-6, TNF- α , TRAIL, OPG, sRANKL, sFasL (ze względu na wyższą medianę w grupie hiperT vs. kontrola)
3. Niższe wyniki wskazują na test bardziej dodatni: IL-1 β (ze względu na niższą medianę w grupie hiperT vs. kontrola)

Wyniki analizy przedstawiono w poniższej Tabeli 19.

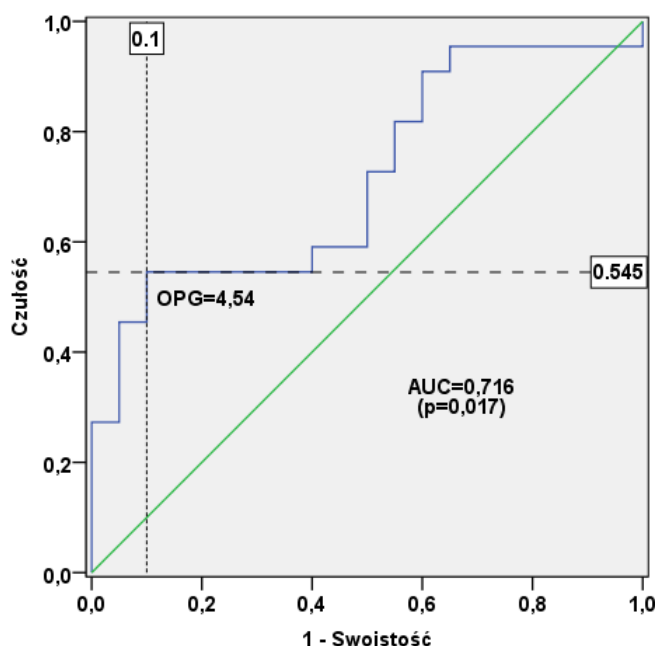
Tabela 19. Podsumowanie analizy ROC grupy dzieci z **nadczynnością** tarczycy i kontrolnej. AUC istotnie różne od 0,5 wyróżniono kolorem zielonym, brak istotnych różnic - kolorem czerwonym

Powierzchnia pod krzywą: hiperT vs. grupa kontrolna					
Zmienna testowana	Powierzchnia	Błąd standardowy	Istotność asymptotyczna	Asymptotyczny 95% przedział ufności	
				Dolna wartość graniczna	Górna wartość graniczna
IL-6 [pg/ml]	0,570	0,091	0,435	0,392	0,749
TNF- α [pg/ml]	0,652	0,085	0,092	0,485	0,820
IL-1 β [pg/ml]	0,523	0,094	0,801	0,338	0,707
TRAIL [pg/ml]	0,720	0,083	0,015	0,558	0,883
OPG [pmol/l]	0,716	0,080	0,017	0,559	0,873
sRANKL [pmol/l]	0,567	0,091	0,458	0,389	0,745
sFasL [ng/ml]	0,698	0,097	0,055	0,495	0,888

Dla TRAIL i OPG stwierdzono AUC istotnie różne od 0,5: kolejno 0,72 dla TRAIL ($p=0,015$) i 0,716 dla OPG ($p=0,017$); obie wartości AUC są porównywalne. Obie istotne krzywe ROC przedstawiono na poniższych Wykresach 91 i 92.



Wykres 91. Krzywa ROC stężenia TRAIL, grupa dzieci z nadczynnością tarczycy vs. grupa kontrolna, AUC=0,72 ($p=0,015$), punkt odcięcia 54,6 pg/ml, czulość: 95,5%, swoistość: 50%



Wykres 92. Krzywa ROC stężenia OPG, grupa dzieci z nadczynnością tarczycy vs. grupa kontrolna, AUC=0,716 (p=0,017), punkt odcięcia 4,54 pmol/l, czułość: 54,5%, swoistość: 90%

Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, że TRAIL i OPG są markerami nadczynności tarczycy o przeciętnej skuteczności na podstawie wartości AUC; TRAIL cechuje się bardzo wysoką czułością (95,5%), ale niską swoistością (50%); OPG wykazuje zaś niską czułość (54,5%) i wysoką swoistość (90%), testy te więc uzupełniają się. Stężenia obu markerów są podwyższone w nadczynności tarczycy w porównaniu do dzieci zdrowych w eutyreozie.

Krzywe ROC: różnicowanie dzieci z niedoczynnością tarczycy z grupą kontrolną

W analizie przyjęto następujące założenia:

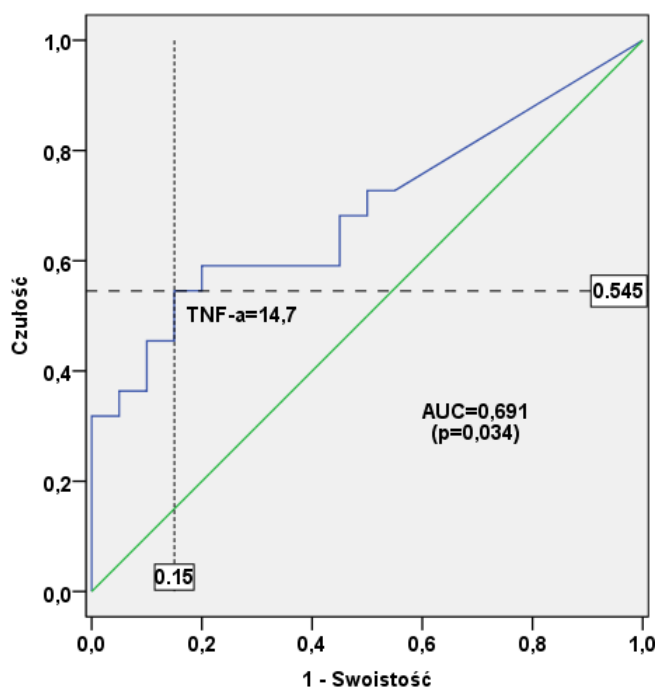
1. Dodatnia wartość zmiennej stanu: przynależność do grupy z niedoczynnością tarczycy; grupa kontrolna: zdrowa kontrola
2. Wyższe wyniki wskazują na test bardziej dodatni dla wszystkich badanych cytokin: IL-6, TNF- α , IL-1 β , TRAIL, OPG, sRANKL, sFasL (ze względu na wyższą medianę w grupie z niedoczynnością vs. kontrola)

Wyniki analizy przedstawiono w poniższej Tabeli 20.

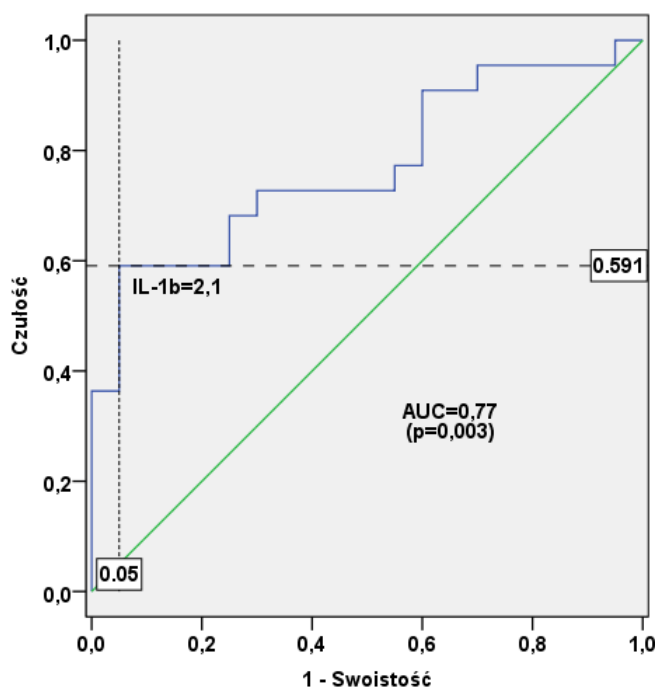
Tabela 20. Podsumowanie analizy ROC grupy dzieci z **niedoczynnością** tarczycy i kontrolnej. AUC istotnie różne od 0,5 wyróżniono kolorem zielonym, brak istotnych różnic - kolorem czerwonym

Powierzchnia pod krzywą: hipoT vs. grupa kontrolna					
Zmienna testowana	Powierzchnia	Błąd standardowy	Istotność asymptotyczna	Asymptotyczny 95% przedział ufności	
				Dolna wartość graniczna	Górna wartość graniczna
IL-6 [pg/ml]	0,601	0,088	0,262	0,428	0,774
TNF- α [pg/ml]	0,691	0,082	0,034	0,529	0,852
IL-1 β [pg/ml]	0,770	0,073	0,003	0,627	0,914
TRAIL [pg/ml]	0,531	0,091	0,734	0,353	0,709
OPG [pmol/l]	0,661	0,084	0,074	0,496	0,827
sRANKL [pmol/l]	0,630	0,092	0,151	0,450	0,809
sFasL [ng/ml]	0,897	0,064	0,001	0,772	1,000

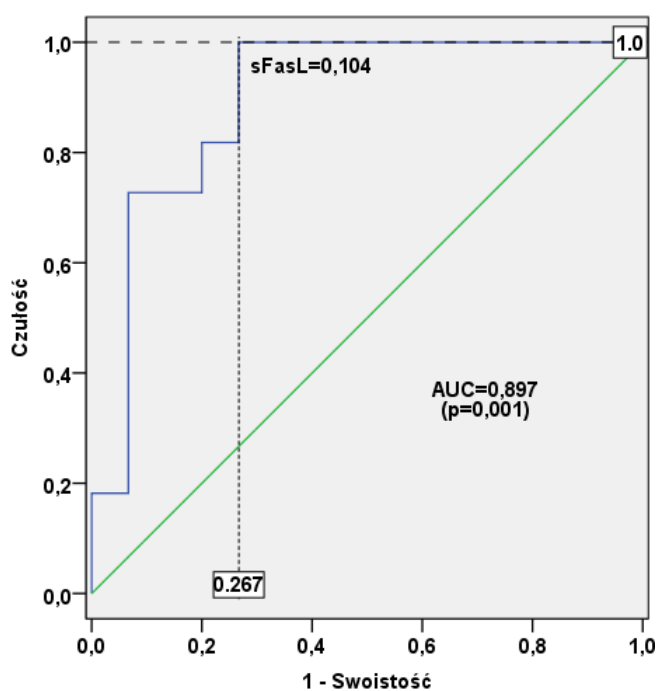
Zidentyfikowano trzy cytokiny, dla których AUC istotnie różniło się od 0,5: sFasL (AUC=0,897 – wartość najwyższa w całej analizie ROC; p=0,001), IL-1 β (AUC=0,77; p=0,003) i TNF- α (AUC=0,691; p=0,034). Krzywe ROC dla badanych cytokin przedstawiono poniżej na Wykresach (93-95).



Wykres 93. Krzywa ROC stężenia TNF- α , grupa dzieci z niedoczynnością tarczycy vs. grupa kontrolna, AUC=0,691 (p=0,034), punkt odcięcia 14,7 pg/ml, czulość: 54,5%, swoistość: 85%



Wykres 94. Krzywa ROC stężenia IL-1 β , grupa dzieci z niedoczynnością tarczycy vs. grupa kontrolna, AUC=0,77 (p=0,003), punkt odcięcia 2,1pg/ml, czułość: 59,1%, swoistość: 95%



Wykres 95. Krzywa ROC stężenia sFasL, grupa dzieci z niedoczynnością tarczycy vs. grupa kontrolna, AUC=0,897 (p=0,001), punkt odcięcia 0,104 ng/ml, czułość: 100%, swoistość: 73,3%

Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, że sFasL jest najskuteczniejszym markerem niedoczynności tarczycy, gdyż wartość AUC wynosząca 0,897 jest najbardziej zbliżona do jedności, czyli cechy charakterystycznej optymalnego testu diagnostycznego. Spośród wszystkich analizowanych cytokin, cechuje się ponadto bardzo wysoką czułością (100%) i wysoką swoistością (73,3%).

Zarówno IL-1 β , jak i TNF- α są nieco słabszymi markerami niedoczynności tarczycy w odniesieniu do zdrowej grupy kontrolnej – cechują się wysoką swoistością (95% i 85%) i przeciętną czułością (59,1% i 54,5%) – stwierdzenie u pacjentów stężeń tych cytokin poniżej punktów odcięcia z wysokim prawdopodobieństwem wyklucza niedoczynność tarczycy. Stężenia wszystkich trzech wymienionych markerów są podwyższone w niedoczynności tarczycy.

Krzywe ROC: różnicowanie grup dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy

Zmodyfikowano parametry analizy ROC celem weryfikacji hipotezy o możliwości dyskryminacji obu grup dzieci z zaburzeniami hormonalnymi, przyjmując następujące założenia:

1. Dodatnia wartość zmiennej stanu: przynależność do grupy z nadczynnością tarczycy; grupa kontrolna: niedoczynność tarczycy
2. Wyższe wyniki wskazują na test bardziej dodatni dla: TRAIL, OPG, (ze względu na wyższą medianę w grupie z nadczynnością vs. niedoczynność tarczycy)
3. Niższe wyniki wskazują na test bardziej dodatni dla: IL-6, TNF- α , IL-1 β , sRANKL, sFasL (ze względu na niższą medianę lub równość median i niższą średnią /IL-6/ w grupie z nadczynnością vs. niedoczynność tarczycy)

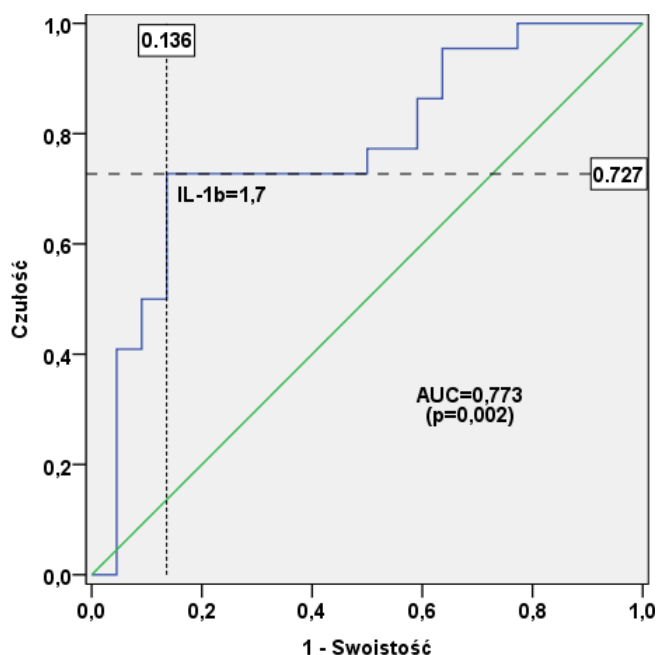
Wyniki analizy przedstawiono w poniższej Tabeli 21.

Tabela 21. Podsumowanie analizy ROC grupy dzieci z **nadczynnością i niedoczynnością** tarczycy. AUC istotnie różne od 0,5 wyróżniono kolorem zielonym, brak istotnych różnic - kolorem czerwonym

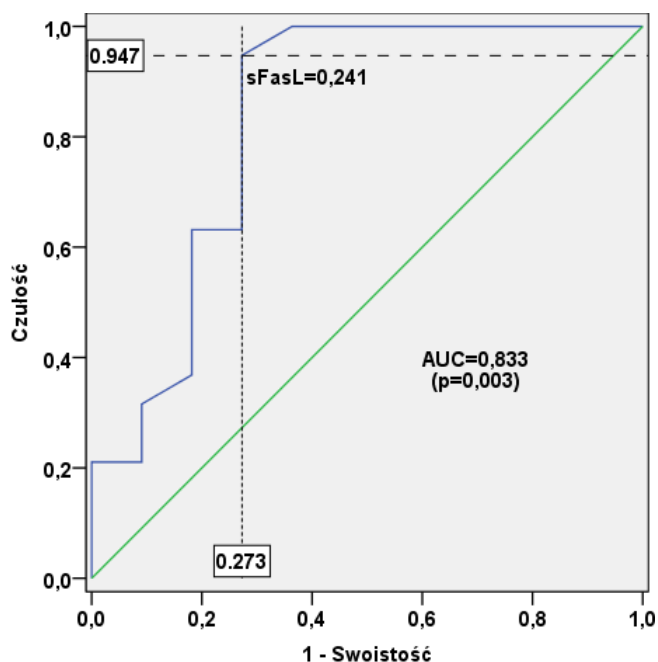
Powierzchnia pod krzywą: hiperT vs. hipot					
Zmienna testowana	Powierzchnia	Błąd standardowy	Istotność asymptotyczna	Asymptotyczny 95% przedział ufności	
				Dolna wartość graniczna	Górna wartość graniczna
IL-6 [pg/ml]	0,536	0,088	0,681	0,363	0,709
TNF- α [pg/ml]	0,572	0,089	0,411	0,397	0,748
IL-1 β [pg/ml]	0,773	0,073	0,002	0,629	0,916
sRANKL [pmol/l]	0,572	0,088	0,411	0,400	0,745
sFasL [ng/ml]	0,833	0,090	0,003	0,656	1,000
TRAIL [pg/ml]	0,731	0,077	0,009	0,580	0,883
OPG [pmol/l]	0,584	0,089	0,342	0,410	0,757

Trzy z przebadanych cytokin pozwalają na skuteczne różnicowanie grup dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy: IL-1 β (AUC=0,773; p=0,002) i sFasL (AUC=0,833; p=0,003) – oba będące markerami niedoczynności tarczycy oraz TRAIL (AUC=0,731; p=0,009), wcześniej zidentyfikowany jako marker nadczynności tarczycy.

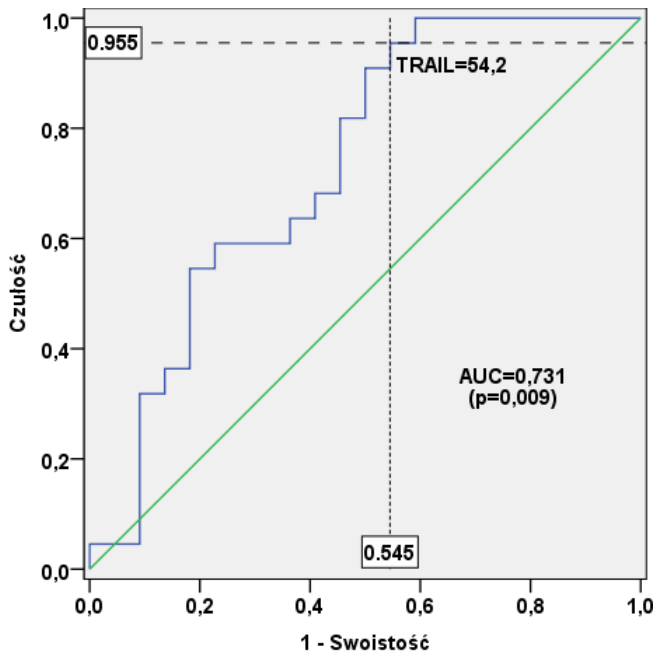
Krzywe ROC badanych cytokin przedstawiono na poniższych Wykresach (96-98).



Wykres 96. Krzywa ROC stężenia IL-1 β , grupa dzieci z niedoczynnością tarczycy vs. dzieci z nadczynnością tarczycy, AUC=0,773 (p=0,002), punkt odcięcia 1,7 pg/ml, czulość: 72,7%, swoistość: 86,4%



Wykres 97. Krzywa ROC stężenia sFasL, grupa dzieci z niedoczynnością tarczycy vs. dzieci z nadczynnością tarczycy, AUC=0,833 (p=0,003), punkt odcięcia 0,241 ng/ml, czulość: 94,7%, swoistość: 72,7%



Wykres 98. Krzywa ROC stężenia TRAIL, grupa dzieci z nadczynnością tarczycy vs. dzieci z niedoczynnością tarczycy, AUC=0,731 (p=0,009), punkt odcięcia 54,2 pg/ml, czułość: 95,5%, swoistość: 45,5%

IL-1 β , charakterystyczna dla niedoczynności tarczycy, pozwala również różnicować grupy dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy z podobną skutecznością jak grupy z niedoczynnością tarczycy i kontrolną (AUC=0,773; p=0,002 vs. AUC=0,77; p=0,003), przy niższej wartości punktu odcięcia (1,7 pg/ml vs. 2,1 pg/ml), z wyższą czułością (72,7% vs. 59,1%) i nieco niższą swoistością (86,4% vs. 95%) (Wykres 94 i 96).

Ponadto sFasL, zidentyfikowany wcześniej również jako marker niedoczynności tarczycy, pozwala bardzo efektywnie różnicować grupy dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy (AUC=0,833; p=0,03 vs. AUC=0,897; p=0,001) przy wyższej wartości punktu odcięcia (0,241 ng/ml vs. 0,104 ng/ml), nieco niższej, ale nadal bardzo wysokiej czułości (94,7% vs. 100%) i porównywalnej swoistości (72,7% vs. 73,3%). sFasL cechuje się zatem największą zdolnością różnicowania grup dzieci z niedoczynnością tarczycy i grupą zdrową oraz obu schorzeń tarczycy u dzieci (nadczynność i niedoczynność) między sobą (prezentuje najwyższe wartości AUC) (Wykres 95 i 97).

TRAIL, charakterystyczny dla grupy dzieci z nadczynnością tarczycy, umożliwia również różnicowanie grup dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy z porównywalną skutecznością (AUC=0,731, p=0,009 vs. AUC=0,72, p=0,015), przy porównywalnej wartości punktu odcięcia (54,2 pg/ml vs. 54,6 pg/ml), takiej samej czułości (95,5%) oraz niskiej swoistości w obu przypadkach (45,5% vs. 50%). Wykres 91 i 98.

Na podstawie całej analizy krzywych ROC należy stwierdzić, że stężenie sFasL jest optymalnym parametrem dyskryminującym wszystkie grupy – osiąga bardzo wysoką czułość i wysoką swoistość w różnicowaniu grupy dzieci z niedoczynnością tarczycy i grupą dzieci zdrowych oraz grup dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy między sobą.

4.4. Podsumowanie wyników

1. Struktura płci badanych grup była porównywalna (brak istotnych różnic).
2. Stwierdzono brak istotnych różnic między dziewczynkami i chłopcami w grupach dzieci: z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy pod względem badanych parametrów (wiek, BMI, BMI-SDS, wskaźnik Cole'a, TSH, ft4, ft3, TRAb, ATG, ATPO, IL-6, TNF- α , IL-1 β , TRAIL, OPG, sRANK, sFasL).
3. W grupie kontrolnej stężenie sRANKL było istotnie wyższe u dziewcząt w porównaniu do chłopców, nie stwierdzono istotnych różnic pod względem płci pozostałych badanych parametrów (wiek, BMI, BMI-SDS, wskaźnik Cole'a, TSH, ft4, ft3, TRAb, ATG, ATPO, IL-6, TNF- α , IL-1 β , TRAIL, OPG, sFasL).
4. Trzy badane grupy (dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy oraz kontrolna) nie różniły się istotnie między sobą: wiekiem, BMI, BMI-SDS, wskaźnikiem Cole'a oraz stężeniami: IL-6, TNF- α i sRANKL.
5. Stwierdzono istotne różnice pomiędzy trzema badanymi grupami (dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy oraz kontrolną) w stężeniach:
 - a. TSH
 - i. hipoT > hiperT
 - ii. hipoT > kontrola
 - iii. hiperT < kontrola
 - b. ft4
 - i. hipoT < hiperT
 - ii. hipoT < kontrola
 - iii. hiperT > kontrola
 - c. ft3
 - i. hipoT < hiperT
 - ii. hiperT > kontrola
 - d. TRAb
 - i. hipoT < hiperT
 - ii. hiperT > kontrola
 - e. ATG
 - i. hipoT > kontrola
 - ii. hiperT > kontrola
 - f. ATPO
 - i. hipoT > kontrola
 - ii. hiperT > kontrola
 - g. IL-1 β

- i. hipoT > hiperT
 - ii. hipoT > kontrola
 - h. TRAIL
 - i. hipoT < hiperT
 - ii. hiperT > kontrola
 - i. OPG
 - i. hiperT > kontrola
 - j. sFasL
 - i. hipoT > hiperT
 - ii. hipoT > kontrola.
- 6. Stwierdzono istotne korelacje nieparametryczne pomiędzy stężeniami badanych cytokin (IL-6, TNF- α , IL-1 β , TRAIL, OPG, sRANKL, sFasL) w grupach dzieci:
 - a. w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy dodatnie korelacje stężeń:
 - i. TNF- α i IL-6
 - ii. OPG i IL-6
 - iii. TRAIL i TNF- α
 - iv. OPG i TNF- α
 - v. sRANKL i TNF- α
 - vi. sFasL i TNF- α
 - vii. sRANKL i OPG
 - b. w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy dodatnie korelacje stężeń:
 - i. IL-1 β i TNF- α
 - ii. IL-1 β i OPG
 - iii. TRAIL i OPG
 - iv. TRAIL i sRANKL
 - v. sFasL i OPG
 - c. w grupie kontrolnej:
 - i. ujemną korelację IL-1 β i TNF- α
 - ii. dodatnią korelację sFasL i sRANKL
 - d. nie stwierdzono podobnych wspólnych korelacji w trzech badanych grupach dzieci, a korelacja IL-1 β i TNF- α w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy i kontrolnej miała przeciwny charakter.
 - e. stwierdzone profile korelacji stężeń cytokin były charakterystyczne dla danej grupy dzieci o określonym schorzeniu tarczycy.
- 7. Zidentyfikowano następujące istotne korelacje nieparametryczne stężenia badanych cytokin (IL-6, TNF- α , IL-1 β , TRAIL, OPG, sRANK i sFasL) z wiekiem, stanem

odżywienia (BMI, BMI-SDS, wskaźnik Cole'a) oraz parametrami hormonalnymi i immunologicznymi (stężenie TSH, fT4, fT3, TRAb, ATG i ATPO):

- a. w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy dodatnie korelacje stężeń:
 - i. IL-1 β i ATPO
 - ii. TRAIL i fT4
 - iii. TRAIL i TRAb
 - iv. sRANKL i ATPO
 - v. sFasL i BMI-SDS
 - b. w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy dodatnie korelacje stężeń:
 - i. TNF- α i ATPO
 - ii. TRAIL i fT4
 - iii. TRAIL i fT3
 - iv. sRANKL i fT4
 - v. sRANKL i fT3
 - vi. oraz ujemną korelację sRANKL i TSH
 - c. w grupie kontrolnej:
 - i. ujemną korelację TRAIL i ATPO
 - ii. dodatnią korelację sRANKL i wieku pacjentów
 - d. dodatnia korelacja TRAIL i fT4 była wspólna dla grup dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy
 - e. ponadto stwierdzone profile korelacji były charakterystyczne dla danej grupy.
8. Analiza krzywych ROC:
- a. grupy dzieci z nadczynnością tarczycy i kontrolną różnicuje:
 - i. stężenie TRAIL (bardzo wysoka czułość, niska swoistość)
 - ii. stężenie OPG (niska czułość, bardzo wysoka swoistość)
 - b. grupy dzieci z niedoczynnością tarczycy i kontrolną różnicuje:
 - i. stężenie TNF- α (niska czułość, wysoka swoistość)
 - ii. stężenie IL-1 β (niska czułość, bardzo wysoka swoistość)
 - iii. stężenie sFasL (bardzo wysoka czułość, wysoka swoistość)
 - c. grupy dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy różnicuje:
 - i. stężenie IL-1 β (przeciętna czułość, wysoka swoistość)
 - ii. stężenie sFasL (bardzo wysoka czułość, wysoka swoistość)
 - iii. stężenie TRAIL (bardzo wysoka czułość, niska swoistość)
 - d. największą zdolność różnicowania badanych grup w całej analizie krzywych ROC wykazało stężenie sFasL.

5. Dyskusja

Badania ostatnich lat potwierdziły istotne znaczenie cytokin prozapalnych, proapoptotycznych i antyapoptotycznych w patogenezie autoimmunologicznej choroby tarczycy. Dowiedziono, że te drobnocząsteczkowe glikoproteiny kontrolują proliferację, różnicowanie i apoptozę komórek tarczycowych. Zwiększone lub obniżone wydzielanie cytokin odgrywa ważną rolę w patogenezie autoimmunologicznej choroby tarczycy, manifestującej się niedoczynnością tarczycy w wyniku przewlekłego autoimmunologicznego zapalenia tarczycy lub nadczynnością w chorobie Gravesa-Basedowa. W przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniu tarczycy ma miejsce niszczenie gruczołu tarczowego na drodze reakcji cytotoksycznych, natomiast w chorobie Gravesa-Basedowa dochodzi do rozrostu gruczołu na skutek stymulacji komórek pęcherzykowych przez przeciwciała przeciwreceptorowe TRAb.

Wobec niepokojącego zjawiska wzrostu zachorowań również w najmłodszych grupach wiekowych, autoimmunizacyjne zaburzenia czynności tarczycy stają się ważnym problemem pediatrycznym. W pracy podjęto próbę określenia stężenia cytokin prozapalnych: IL-1 β i IL-6, proapoptotycznych: TNF- α , TRAIL, sFasL i RANKL i antyapoptotycznej OPG w surowicy dzieci i młodzieży w wieku rozwojowym. Wyniki przeprowadzonych badań własnych zaowocowały interesującymi obserwacjami, dotyczącymi patogenezy autoimmunologicznej choroby tarczycy.

Niektóre prozapalne cytokiny mogą być produkowane w formie białek związanych z błoną komórkową tyreocyta, podczas gdy inne są uwalniane jako rozpuszczalne cząsteczki o wysokim powinowactwie do receptorów powierzchniowych błony komórkowej. Cytokiny współdziałają ze sobą, a łączny wpływ wielu różnych cytokin oraz mediatorów molekularnych stanowi wzór reaktywności tkanek, charakterystyczny dla danego schorzenia autoimmunologicznego. Profil cytokin określa rodzaj organo-specyficznej odpowiedzi immunologicznej w autoimmunologicznych chorobach tarczycy, manifestujących się odmiennymi objawami klinicznymi. Prawdopodobnie udział komórek tarczycowych w odpowiedzi immunologicznej polega zarówno na zdolności do produkcji cytokin jak i na sposobie reagowania na nie.

Prozapalne cytokiny IL-1 β , IL-6 i inne IL-8, TGF- β , IL-16 oraz chemokiny CXCL10, CXCL-19, RANTES aktywują limfocyty T pamięci i są syntetyzowane przez tyreocyty *in vitro*^[184,185]. Cytokiny mogą modulować wzrost i funkcje komórek nabłonkowych tarczycy^[134,186]. IL-1, TNF- α , INF- α , β i γ hamują zależny od TSH wychwytywanie I¹²⁵ i wydzielanie hormonów tarczycy w hodowlach kultur ludzkich tyreocytów^[187]. Gerard i wsp.^[188] wykazali, że stymulowanie tyreocytów kombinacją cytokin o profilu Th1: IL-1 α i INF- γ powoduje zmniejszenie produkcji peroksydazy tarczycowej TPO i obniżenie ekspresji mRNA enzymu.

Gianoukakies i wsp.^[189] w swoich badaniach dowiedli, że IL-1 β indukuje produkcję hialuronianu przez komórki nabłonka tarczycy oraz fibroblasty tarczycowe, przyczyniając się do rozwoju choroby Gravesa-Basedowa z wolem. Jest prawdopodobne, że występowanie w wewnątrztrzczycowym środowisku różnych mediatorów molekularnych, w tym cytokin i przeciwciał przeciwtarczycowych moduluje funkcje tarczycy oraz przyczynia się do powstawania wola.

Studia dotyczące ekspresji cytokin w autoimmunologicznej chorobie tarczycy nie są jednoznaczne, a badania w grupie dzieci i młodzieży stanowią rzadkość. Większość badań związanych z udziałem cytokin w autoimmunologicznej chorobie tarczycy opiera się na wynikach badań *in vitro* ekspresji genów cytokin obecnych w komórkach pęcherzykowych tarczycy lub na ocenie wydzielanych cytokin *in vivo* przez linie komórkowe tarczycy. Poziom cytokin we krwi obwodowej jest wypadkową działania parakrynnego i autokrynnego cytokin występujących lokalnie w środowisku tarczycy, dodatkowo ocena stężenia jest ograniczona metodologicznie i zależna od precyzji, czułości i swoistości metody oznaczania^[95].

W AITD udokumentowano występowanie odpowiedzi immunologicznej typu Th1 i Th2, ale specyficzna patogenetyczna rola cytokin w obu przeciwstawnych klinicznie stanach chorobowych nie jest jednoznaczna. cAIT charakteryzuje się niszczeniem komórek tarczycy i dominującą odpowiedzią immunologiczną typu Th1, wydzielaniem cytokin IL-1 β , IL-2, TNF- α i IFN- γ . Przeciwnie, w GD gdzie nadczynność tarczycy indukowana przez stymulujące przeciwciała TSAb przeważa nad niszczeniem tkanek, dominuje wzór wydzielania cytokin typu Th2 takich jak: IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 i IL-13. Odpowiedzi Th1 i Th2 korelują z charakterystycznym profilem cytokin. Działania cytokin są różnorodne, a efekty tego działania mogą być hamowane lub promowane przez inne cytokiny. Komórki Th1 są zaangażowane w reakcje zapalne oraz komórkową odpowiedź immunologiczną. Odpowiadające im cytokiny promują reakcje cytotoksyczne i procesy zapalne, uczestnicząc w opóźnionej reakcji nadwrażliwości tkanek. Cytokiny Th2 zwiększają produkcję przeciwciał oraz uczestniczą w humoralnej odpowiedzi immunologicznej, promując reakcje alergiczne i odpornościowe. Przewaga wydzielania cytokin Th1 lub Th2 waha się od jednego stanu chorobowego do drugiego i może prowadzić do różnej immunopatologicznie odpowiedzi. Cytokiny wydzielane przez obie populacje limfocytów T wykazują wzajemnie hamujące działanie oraz mogą przesunąć równowagę odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1 lub Th2^[95].

Nanba i Watanabe^[86] zbadali proporcję występowania odpowiedzi immunologicznej typu Th1, Th2 i Th17 oraz produkowanych cytokin IFN- γ IL-4 i IL-17 w przebiegu choroby Hashimoto oraz Gravesa-Basedowa. Ilość komórek Th1 we krwi obwodowej była wyższa u pacjentów z ciężkim przebiegiem HT niż u pacjentów z łagodną postacią HT ($p < 0,05$), a ilość komórek Th2 była niższa u pacjentów z ciężkim przebiegiem HT, niż u pacjentów z łagodną

chorobą HT ($p < 0,001$). Dlatego stwierdzono wyższy stosunek odpowiedzi Th1/Th2 w ciężkim przebiegu HT ($p < 0,001$). Udział limfocytów Th17 u pacjentów z AITD był wyższy niż w grupie kontrolnej, a ilość tych komórek u pacjentów z oporną na leczenie postacią GD była wyższa, niż w grupie pacjentów z GD w czasie remisji ($p < 0,05$).

W przedstawianej pracy własnej zbadano stężenie cytokin o profilu Th1: IL-1 β i TNF- α oraz Th2: IL-6 w surowicy dzieci ze zdiagnozowanym przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy, przebiegającym z niedoczynnością tarczycy oraz w surowicy dzieci z chorobą Gravesa-Basedowa manifestującą się nadczynnością tarczycy, w obu stanach chorobowych przed wprowadzeniem leczenia. Najwyższą medianę stężenia IL-1 β stwierdzono w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy (2,16 pg/ml), najniższą w grupie z nadczynnością tarczycy (1,39 pg/ml), natomiast w grupie kontrolnej mediana stężenia IL-1 β wyniosła 1,88 pg/ml. Stężenie IL-1 β różniło się istotnie pomiędzy badanymi grupami dzieci z niedoczynnością tarczycy i nadczynnością tarczycy ($p < 0,01$) oraz niedoczynnością tarczycy i grupą kontrolną ($p < 0,05$). Nie odnotowano różnicy stężenia IL-1 β pomiędzy grupą dzieci z nadczynnością tarczycy i grupą kontrolną ($p > 0,05$). Wyniki potwierdzają istotniejszą rolę IL-1 β w niedoczynnej fazie przewlekłego autoimmunologicznego zapalenia tarczycy niż w fazie nadczynnej ciężkiej postaci GD u dzieci. Najwyższą medianę stężenia TNF- α stwierdzono w grupie z niedoczynnością tarczycy (15,08 pg/ml), a najniższą w grupie kontrolnej (0,96 pg/ml), natomiast w grupie z nadczynnością tarczycy mediana stężenia TNF- α wyniosła 13,63 pg/ml. W pracy własnej nie stwierdzono istotnych różnic stężenia TNF- α między badanymi grupami dzieci ($p = 0,067$). Natomiast mediany stężenia IL-6 w grupie z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy były równie (1,6 pg/ml), a mediana w grupie kontrolnej była nieco niższa i wynosiła (1,56 pg/ml). W pracy własnej nie stwierdzono istotnych różnic stężenia IL-6 pomiędzy badanymi grupami dzieci ($p = 0,48$). Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że IL-6 nie odgrywa istotnej patologicznej roli w autoimmunologicznej chorobie tarczycy u dzieci.

Dotychczas patofizjologiczna rola cytokin w rozwoju AITD nie jest jasno określona. Działanie cytokin może wiązać się z utratą funkcji bariery nabłonka tarczycy i promowaniem dostępu komórek układu odpornościowego do antygenów wewnątrzpęcherzykowych. Cytokiny IL-1 β TNF- α , IFN- γ znane są ze zmiany integralności nabłonka poprzez zmianę ekspresji i lokalizacji białek przezbłonowych, tworzących połączenia międzykomórkowe w różnych komórkach nabłonkowych organizmu człowieka. Przewlekły proces zapalny może ułatwić to działanie poprzez nadmierną aktywację układu immunologicznego i indukcję syntezy autoprzeciwciał^[190,191,192]. Naciekanie tarczycy przez odpornościowe komórki T i B charakterystyczne dla AITD, umożliwia lokalne uwalnianie cytokin prozapalnych. Ponadto cytokiny takie jak IL-1, IL-6, IL-8 są również wytwarzane przez komórki tarczycy w AITD oraz wpływają bezpośrednio na zapalenie tarczycy^[185].

Rebuffat i wsp.^[193] badali wpływ prozapalnych cytokin IL-1 β i TNF- α na szczelność nabłonka tyreocytów w autoimmunologicznych chorobach tarczycy. Cytokiny te stymulują wydzielanie IL-6 i mogą modyfikować integralność nabłonka poprzez zmianę ekspresji białek przezłonowych i komórek adhezyjnych. Aby zbadać rolę cytokin autorzy przebadali profile ekspresji białek przezłonowych, tworzących połączenia komórkowe typu zwierającego (*Junction proteins*) ZO-1, Claudin, JAM-A oraz cytokin prozapalnych w ludzkich preparatach tarczycy, za pomocą testów immunochemicznych. Także zbadano wpływ IL-1 β na integralność nabłonka w hodowlach tyreocytów pacjentów chorych na chorobę Hashimoto, techniką Western-blot. Wysoki poziom ekspresji wymienionych białek w komórkach pęcherzykowych tarczycy wykazano w chorobie Gravesa-Basedowa, w przeciwieństwie do zmniejszonej ekspresji białek łączących JAM-A i ZO-1 w komórkach tarczycy pochodzących od pacjentów chorujących na zapalenie tarczycy typu Hashimoto. Potwierdza to utratę integralności komórek pęcherzykowych tarczycy, na skutek zachodzących w HT procesów zapalnych oraz apoptozy. Wyniki te wskazują, że w chorobie Hashimoto i w chorobie Gravesa-Basedowa występują różne wzorce ekspresji białek tworzących połączenia międzykomórkowe a zmiana ich ekspresji skutkuje utratą integralności nabłonka komórek pęcherzykowych tarczycy w HT. Wykazano, że IL-1 β modyfikuje szczelność nabłonka tyreocytów, zmieniając ekspresję i lokalizację białek łączących Claudin i ZO-1. Potwierdza to ważną patogenetyczną rolę, jaką odgrywa IL-1 β w autoimmunizacji tarczycy^[161].

W pracy własnej w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy stwierdzono następującą dodatnią korelację IL-1 β i TNF- α oraz dodatnią IL-1 β i OPG (odpowiednio: $r=0,46$ i $r=0,44$; $p<0,05$ i $p<0,05$,) a w grupie kontrolnej ujemną korelację IL-1 β i TNF- α ($r=-0,58$; $p<0,01$).

Podwyższone stężenie IL-1 β oraz dodatni profil korelacji potwierdzają zapalny charakter przebiegu choroby Hashimoto u dzieci.

Analiza krzywych ROC wykazała, że IL-1 β posiada dobrą skuteczność różnicowania pomiędzy dziećmi zdrowymi i chorymi z niedoczynnością tarczycy w przebiegu przewlekłego autoimmunologicznego zapalenia tarczycy (AUC=0,77; $p=0,003$) o czułości (59,1%) i o wysokiej swoistości (95%). Stwierdzenie u pacjentów stężenia IL-1 β poniżej punktu odcięcia 2,1 pg/ml z wysokim prawdopodobieństwem wyklucza niedoczynność tarczycy. Ponadto stwierdzono znacznie wyższe stężenie IL-1 β w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy w porównaniu do grupy z nadczynnością tarczycy. Krzywa ROC dla IL-1 β wykazała wysoką czułość (72,7%) i wysoką swoistość (86,4%) różnicowania grupy dzieci z przewlekłą autoimmunologiczną chorobą tarczycy i chorobą Gravesa-Basedowa z podobną skutecznością jak grupy z niedoczynnością tarczycy i kontrolną (AUC=0,773; $p=0,002$ vs. AUC=0,77; $p=0,003$), przy niższej wartości punktu odcięcia 1,7 pg/ml vs. 2,1 pg/ml. Rezultat ten potwierdza, że stężenie IL-1 β w surowicy może być skutecznym markerem

niedoczynności tarczycy w przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniu tarczycy. Stężenie IL-1 β jest podwyższone w niedoczynności tarczycy.

Prozapalne efekty działania cytokin prezentowane *in vivo* są wynikiem synergistycznego lub antagonistycznego działania dwóch lub kilku cytokin. Badacze korzystając z ilościowych metod analitycznych zbadali cytokiny produkowane przez komórki pęcherzykowe tarczycy, które aktywują limfocyty T oraz limfocyty B i tym samym sprawują kluczową rolę w koordynowaniu reakcji immunologicznych w patogenezie autoimmunologicznej choroby tarczycy^[131].

Obecność TNF- α w surowicy pacjentów z autoimmunologiczną chorobą tarczycy może być ważnym bodźcem do produkcji IL-6. Prowadzono badania dotyczące profilu cytokin TNF- α i IL-6 w surowicy dorosłych pacjentów chorych na AITD w nadczynności i niedoczynności tarczycy przed i po normalizacji funkcji tarczycy^[194]. Dane literaturowe potwierdzają podwyższony poziom IL-6 i TNF- α zaobserwowany w nadczynności tarczycy w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa^[133,195,196,197,198] oraz w przypadku oftalmopatii tarczycowej^[199].

Odmienne spostrzeżenia poczynili Weetman i wsp.^[159], którzy nie odnotowali podwyższonego poziomu IL-6 u pacjentów z nadczynnością tarczycy. Podobnie badania Pichler i wsp.^[200] w grupie 39 pacjentów ze świeżo zdiagnozowaną chorobą Gravesa-Basedowa wykazały wyższe wartości IL-6 tylko w 4 przypadkach GD w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną.

Kiziltunc i Basoglu^[201] przebadali grupę 27 dorosłych pacjentów w wieku 58-64 lat z nieleczoną nadczynnością tarczycy i 23 z nieleczoną niedoczynnością tarczycy, porównując średnie stężenia cytokin TNF- α i IL-6 do grupy 18 zdrowych pacjentów. Stężenie obu badanych cytokin było wyższe w grupie pacjentów z hiperT, natomiast niższe w grupie pacjentów z hipoT, w porównaniu do stężenia w grupie kontrolnej ($p < 0,001$). Po zastosowaniu leczenia wartości stężenia cytokin TNF- α i IL-6 zmniejszyły się w grupie pacjentów z hiperT ($p < 0,01$), ale wzrosły w grupie z hipoT ($p < 0,05$). Podobnie Akalin i wsp.^[202] odnotowali podwyższone stężenie IL-6 w grupie pacjentów z nadczynnością tarczycy w przebiegu GD. Wyniki tych prac sugerują, iż IL-6 może modulować czynność komórek tarczycy, ponieważ odgrywa ważną rolę w różnicowaniu komórek B i aktywacji komórek T, a uwalnianie IL-6 przez tyreocyty może zwiększyć wewnątrztrzęczycową reakcję układu odpornościowego w chorobie Gravesa-Basedowa.

W prezentowanej pracy własnej stwierdzono dodatnią korelację obu badanych cytokin IL-6 z TNF- α w nadczynności tarczycy (r -Spearman'a=0,62; $p < 0,01$), która potwierdziła obserwacje autorów cytowanej pracy Kiziltunc i wsp.^[201]. Wraz ze wzrostem stężenia TNF- α rośnie stężenie IL-6 w nadczynności tarczycy u dzieci. Podobnie jak wymienieni autorzy, tak też i w pracy własnej nie zaobserwowano żadnych korelacji

badanych cytokin IL-6 i TNF- α z wykładnikami stanu hormonalnego tarczycy (fT3, fT4 i TSH) w grupach pacjentów z nadczynnością, niedoczynnością tarczycy i w grupie kontrolnej. Może to sugerować podobny efektorowy mechanizm immunologiczny, występujący w badanych grupach pacjentów.

W nadczynności tarczycy TNF- α stymuluje produkcję i wydzielanie IL-6 przez osteoblasty a dodatnie korelacje obu cytokin mogą potwierdzać sposób synergistycznego działania oraz zaangażowanie w proces resorpcji kości.^[203,204] W pracy własnej, w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy wykazano dodatnie korelacje IL-6 i TNF α z cytokinami biorącymi udział w procesie osteoklastogenezy: TNF- α z sRANKL ($r=0,67$; $p<0,01$) IL-6 z OPG ($r=0,51$; $p<0,05$) i TNF- α z OPG ($r=0,69$; $p<0,01$) oraz cytokinami proapoptotycznymi TNF- α z TRAIL ($r=0,43$; $p<0,05$) i TNF- α z sFasL ($r=0,54$; $p<0,05$). Wszystkie stwierdzone istotne korelacje mają dodatni charakter, co sugeruje ich synergistyczne działanie w nadczynności tarczycy i jednoczesny wzrost stężeń. Powyższy profil korelacji cytokin jest specyficzny dla grupy badanych dzieci z nadczynnością tarczycy – żadnej z powyższych istotnych korelacji nie stwierdzono w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy ani w grupie kontrolnej.

Cytokiny obecne w komórkach pęcherzykowych tarczycy są odpowiedzialne za mechanizmy cytotoksyczne w AITD, choć w literaturze spotyka się sprzeczne opinie na ten temat. W rzeczywistości nie jest jeszcze dostatecznie jasne w jakim stopniu stężenia cytokin w surowicy pacjentów chorych na AITD wynikają z patofizjologicznej funkcji tarczycy a w jakim z reakcji autoimmunologicznych. Ponadto inne czynniki, takie jak terapia przeciwtarczycowa, aktywność pro- i antyapoptotyczna oraz wiek mogą mieć różny wpływ na stężenie i efekty działania krążących cytokin.

Jiskra i wsp.^[205] określili stężenie panelu cytokin sIL-2R, IFN- γ , TNF- α , IL-10, CD30, Bcl-2 w grupie 28 nieleczonych pacjentów z GD i 24 z HT w porównaniu do 15 osób zdrowych, stwierdzając podwyższone wartości TNF- α , IL-10, sIL-2R w grupie chorych z GD w porównaniu do pacjentów z HT i z grupą kontrolną. Autorzy uważają, że zmiany stężenia cytokin pacjentów z GD bardziej wynikają z patofizjologicznej funkcji tarczycy niż z aktywacji układu immunologicznego.

Badacze Diez i wsp.^[194] w grupie 20 pacjentów z nie leczoną nadczynnością tarczycy i 20 z nieleczoną niedoczynnością tarczycy wykazali podwyższony poziom TNF- α i sTHFR-1 przed wprowadzeniem leczenia w obu stanach chorobowych. Po leczeniu nadczynności tarczycy uzyskano znaczące obniżenie TNF- α i redukcję poziomu TNFR-1, natomiast leczenie L-tyroksyną pacjentów z niedoczynnością nie przyniosło zmian stężeń obu parametrów. Wyższe stężenia cytokin w nadczynności tarczycy związanej z GD częściej ulegają normalizacji w wyniku leczenia, podczas gdy u pacjentów z niedoczynnością tarczycy nie obserwuje się obniżenia stężenia cytokin po osiągnięciu normalizacji funkcji tarczycy.

W innym badaniu Aust i wsp.^[184] wykazali wysoki poziom mRNA TNF- α w tkankach pacjentów z chorobą Hashimoto ale niski poziom u pacjentów z GD co sugeruje, że limfocyty pochodzące z tarczycy pacjentów z niedoczynnością tarczycy potencjalnie mogą wydzielać TNF- α .

W pracy własnej jakkolwiek stężenia TNF- α nie różniły się statystycznie pomiędzy badanymi grupami dzieci z niedoczynnością, nadczynnością i kontrolną, najwyższą medianę stężenia TNF- α stwierdzono w grupie z niedoczynnością tarczycy (15,08 pg/ml), a najniższą w grupie kontrolnej (0,96 pg/ml). Analiza krzywych ROC wykazała, że TNF- α różnicuje dzieci zdrowe i dzieci z niedoczynnością tarczycy (AUC=0,691; p=0,034) z czułością (54,5%) i swoistością (85%). TNF- α można zatem uznać markerem niedoczynności tarczycy w przebiegu przewlekłego autoimmunologicznego zapalenia tarczycy z wyznaczonym punktem odcięcia 14,7 pg/ml. Tak więc stężenie TNF- α jest podwyższone w niedoczynności tarczycy u dzieci w przebiegu zapalenia tarczycy typu Hashimoto w porównaniu ze zdrową grupą dzieci. Ponadto, w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy stwierdzono istotną dodatnią korelację: TNF- α i ATPO (r=0,54; p<0,01). Podobną korelację między ATPO i wydzielaniem cytokin TNF- α i IFN- γ zaprezentowali w pracy Karanikas i wsp.^[206]. Ostatnio została potwierdzona hipoteza wykazująca, że przeciwciała ATPO mogą promować TPO-zależną produkcję cytokin, w tym IFN- γ , TNF- α i IL-6^[207].

Rola cytokin w patomechanizmie AITD jest jednak nadal niejasna, a dane literaturowe o skutkach klinicznych działania cytokin w obrębie gruczołu tarczowego są kontrowersyjne. Do tej pory przedstawiono tylko kilka badań dotyczących związków między IL-6 i zapaleniem tarczycy typu Hashimoto. W doświadczeniach na zwierzętach IL-6 odgrywa niewielką rolę w rozwoju autoimmunologicznego zapalenia tarczycy.^[208] W ostatnim badaniu Rugerri i wsp.^[209] znaleźli podwyższony poziom IL-6 u pacjentów z chorobą Hashimoto. Podobne wyniki otrzymała Siemińska i wsp.^[210]. Głównym wnioskiem cytowanych badań było wykazanie podwyższonego stężenia IL-6 w surowicy pacjentów z chorobą Hashimoto w porównaniu z grupą kontrolną, co wskazuje że IL-6 jest zaangażowana w rozwój tej choroby. Podwyższone stężenie IL-6 i przewlekła aktywacja układu immunologicznego tarczycy w chorobie Hashimoto może prowadzić do zaburzenia budowy ściany naczyń i może powodować dysfunkcję śródbłonna naczyń^[211]. Badania innych autorów dowiodły, że IL-6 sprzyja miażdżycy poprzez mechanizmy bezpośrednio związane z przebudową śródbłonna naczyń i pośrednio poprzez stymulowanie wątroby do produkcji białka C-reaktywnego^[212,213].

W pracy własnej w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy nie stwierdzono istotnej różnicy stężenia IL-6 w porównaniu z grupą kontrolną ani pomiędzy grupami dzieci z niedoczynnością i nadczynnością co wskazuje, że stężenie IL-6 nie odgrywa istotnej patologicznej roli w grupie młodocianych pacjentów z AITD.

Proces zaprogramowanej śmierci komórki regulowany jest przez odpowiednią ekspresję pro- i antyapoptotycznych białek, których ekspresja i względne ilości decydują o podatności komórki na apoptozę. Apoptoza odgrywa ważną rolę w patogenezie autoimmunologicznej choroby tarczycy, wpływając na procesy chorobotwórcze prowadzące do uszkodzenia komórek pęcherzykowych tarczycy. Zniszczenie komórek tarczycy i/lub infiltrujących limfocytów w AITD jest głównie konsekwencją procesów apoptotycznych w połączeniu z cytotoksycznością komórkową CD8+ oraz aktywacją układu dopełniacza i zmianami w połączeniach międzykomórkowych w błonie komórkowej tyreocytów. Zewnątrzpochodna, zależna od receptorów droga aktywacji procesu apoptozy przez wzajemne oddziaływanie tzw. ligandów i receptorów śmierci została dokładnie zbadana^[118]. Przez błonowe przekazywanie sygnałów inicjujących apoptozę jest procesem, w który zaangażowane są trzy różne receptory błonowe i ich ligandy. Indukcja apoptozy następuje przez łączenie czynnika martwicy guza TNF- α z jego receptorem błonowym TNF-R1. Receptor Fas (Apo-1 lub CD95), który jest białkiem przezbłonowym typu I i członkiem nadrodziny receptora TNF łączy się z jego ligandem FasL, będącym białkiem przezbłonowym typu II^[214]. TRAIL (Apo2L), ligand z rodziny receptora TNF indukuje apoptozę przez wiązanie ze swoimi receptorami śmierci TRAIL-R1 (DR4) i TRAIL-R2 (DR5)^[215,216].

W dalszej kolejności dochodzi do aktywacji enzymów proteolitycznych kaspaz, które niszczą komórki tarczycy. W normalnych okolicznościach droga Fas jest hamowana przez obecność białek antyapoptotycznych Bcl-2, Bcl-xL i cFLIP, natomiast w stanach zapalnych następuje aktywacja szlaku apoptozy przez cytokiny uwalniane w środowisku zmienionej zapalnie tarczycy^[217]. Badania *in vitro* wykazały, że stężenie TSH hamuje Fas-zależną apoptozę, natomiast brak TSH aktywuje proces apoptozy^[218]. Cytokiny IFN- γ wspólnie z TNF- α lub IL-1 β mogą aktywować Fas-zależną apoptozę w hodowlach komórek pęcherzykowych tarczycy^[219].

Receptory dla TRAIL są również stymulowane w komórkach tarczycy przez cytokiny prozapalne^[82]. TRAIL może pośredniczyć w programowanej śmierci komórki w odpowiednich warunkach^[129]. Bretz i wsp.^[82] wykazali w badaniach *in vitro*, że ekspresja TRAIL w komórkach pęcherzykowych tarczycy była pobudzana przez produkcję cytokin prozapalnych IFN- γ , TNF- α i IL-1 β . Tak więc cytokiny prozapalne takie jak IFN- γ , TNF- α i IL-1 β mogą wpływać na obraz immunologiczny procesu apoptozy. Dodatkowym czynnikiem wywołującym proces programowanej śmierci komórki jest TGF- β . Jego uwolnienie z komórek tarczycy jest stymulowane przez naskórkowy czynnik wzrostu (EGF). W świńskich pęcherzykach tarczycy zarówno TGF- β jak i EGF mogą indukować proces apoptozy^[220]. Dlatego też mechanizm apoptozy w zapaleniu tarczycy typu Hashimoto wydaje się być indukowany przez cytokiny wydzielane przez limfocyty T, obecne w ogniskach nacieków zapalnych w lokalnym środowisku tarczycy^[221]. W chorobie Hashimoto widoczny jest

mechanizm Fas-zależnej apoptozy wraz z obniżoną ekspresją Bcl-2, który jest inhibitorem apoptozy i jest silnie wyrażony w prawidłowych tyreocytach^[116]. W badaniu immunohistochemicznym Kaczmarek i wsp.^[222] wykazano niższą ekspresję Bcl-2 i kaspazy-3 u pacjentów z niedoczynnością tarczycy w porównaniu do osób z grupy kontrolnej. Wynik ten dowodzi, że apoptoza odgrywa ważną rolę w patogenezie autoimmunizacyjnych chorób tarczycy, prowadząc do uszkodzenia komórek tarczycy.

W zmienionej zapalnie tarczycy w zapaleniu tarczycy Fountoulakis i wsp.^[121,223] zaobserwowali wysoki procent apoptozy w komórkach pęcherzykowych tarczycy, przylegających do limfocytów w porównaniu ze zdrową tkanką tarczycową, gdzie nawet w minimalnym stopniu nie odnotowano apoptozy i obecności białka FasL. W zapaleniu tarczycy typu Hashimoto zaobserwowano również większą liczbę komórek CD8+ wyrażających ekspresję Fas niż u osób zdrowych. W badaniach Carli Giordano i wsp.^[221] indukcja procesu apoptozy wewnątrz komórek tarczycowych pacjentów z chorobą Hashimoto została potwierdzona przez obecności FasL w tyreocytach oraz interakcję autokrynną lub parakrynną Fas i FasL. Ponadto aktywowane limfocyty T są możliwym źródłem FasL i mogą brać udział w apoptozie tyreocytów za pośrednictwem innych mechanizmów cytotoksycznych, w których pośredniczą prozapalne cytokiny IL-1 β i TNF- α .

Bossowski i wsp.^[224] w jednym z nielicznych badań dotyczących patogenezy autoimmunologicznej choroby tarczycy w grupie dzieci i młodzieży z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto i chorobą Gravesa-Basedowa, określili aktywność apoptotyczną cytokin Fas/FasL i kaspazy 8 w przebiegu obu przeciwstawnych klinicznie chorób tarczycy. W analizie ekspresji czynników apoptozy Fas i FasL na powierzchni komórek tarczycy wykazano ich istotnie wyższy odsetek u pacjentów z HT (ok. 38%, 26%) w porównaniu z pacjentami z GD (18%, 14%). U pacjentów z HT wykazano znacznie niższy odsetek limfocytów napływających do gruczołu tarczowego z ekspresją Fas i FasL (13%, 22%) w porównaniu z grupą dzieci z GD (odpowiednio 33%, 43%). W analizie ekspresji kaspazy 8 w badanych grupach dzieci i młodzieży wykazano jej obecność u pacjentów z autoimmunologicznymi schorzeniami tarczycy w prążku p55 (kDa) za pomocą metody Western-blot. Obserwacje ww. autorów potwierdzają mechanizm niszczenia komórek tarczycy w wyniku procesów apoptozy zachodzących za pośrednictwem ligandów i receptorów Fas/FasL obecnych na powierzchni komórek pęcherzykowych tarczycy u pacjentów z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto, prowadząc w efekcie do niedoczynności tarczycy. Przeciwnie wzrost aktywności procesu apoptozy w obrębie limfocytów u pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa może doprowadzić z kolei do przewagi proliferacji nad eliminacją komórek tarczycy, a w konsekwencji odpowiadać za rozrost gruczołu tarczowego i apoptozę naciekających limfocytów. Jednoczesna indukcja ekspresji cząsteczek antyapoptotycznych Bcl-2, Bcl-xL, wywołana przez cytokiny Th2 powoduje oporność

tyreocytów na przebiegającą za pośrednictwem Fas apoptozę, zwiększając ich przeżycie^[28,81,83,119,123,124,170,225,226].

Oprócz błonowej postaci receptora Fas, białko to jest wykrywane w postaci rozpuszczalnej (sFas). sFas jest formą receptora Fas pozbawioną regionu przezbłonowego na drodze alternatywnego splicingu^[227]. Uważa się, że sFas wiążąc się z FasL chroni komórki docelowe przed apoptozą indukowaną za pośrednictwem Fas, przez hamowanie interakcji Fas/FasL^[227,228]. Natomiast rozpuszczalna forma liganda sFasL jest proteolitycznym produktem błonowej postaci FasL, powstałym z udziałem metaloproteinaz, przy czym jego rola w procesie apoptozy nie jest do końca wyjaśniona. Postać sFasL jest mniej cytotoksyczna niż związany z błoną FasL, ale rozpuszczalna forma sFasL zachowuje zdolność do współdziałania z Fas. Jest więc prawdopodobne, że sFasL indukuje apoptozę tyreocytów i limfocytów prezentujących na swej powierzchni ekspresję białka Fas^[229,230].

Oddziaływanie sFas/sFasL odgrywa ważną rolę w układzie odpornościowym i utrzymaniu homeostazy wewnątrz gruczołu tarczowego. Prace wielu autorów nad ekspresją rozpuszczalnych form sFas i sFasL w autoimmunologicznej chorobie tarczycy przyniosły sprzeczne doniesienia. Wpływ obu cytokin na aktywność apoptotyczną badano w chorobie Gravesa-Basedowa. Zasugerowano, że poziom sFas w surowicy odgrywa ważną rolę w patogenezie GD^[231]. Potwierdziły to badania Feldkamp i wsp.^[232] stwierdzające podwyższone stężenie sFas w nadczynności tarczycy, które było konsekwencją choroby, niezależnie od podstawowego schorzenia tarczycy. W chorobie Gravesa-Basedowa przebiegającej z oftalmopatią sFas został uznany markerem służącym do oceny zachodzącego procesu immunizacyjnego^[233] oraz aktywności procesu zapalnego^[234] lub pozwalającym ocenić stan rekonwalescencji w oftalmopatii Gravesa^[235]. Ostatnio w badaniu Andrikoula i wsp.^[236] odnotowano podwyższony poziom sFas u pacjentów z wolem.

Stężenie sFasL badano w chorobie Gravesa-Basedowa jako kandydujący marker oceny przebiegu choroby. Badanie Wang i wsp.^[226] wykazało podwyższone stężenie sFasL u nieleczonych pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa z wysokim mianem TRAb oraz u chorych w trakcie remisji z niskim mianem TRAb. Wcześniej podobną zależność stwierdzili Takeda i wsp.^[237] wykazując podwyższone wartości sFasL w chorobie Gravesa-Basedowa. Wyniki badań Kołomecki i wsp.^[238] wykazały wysokie stężenia p53 i sFasL w osoczu chorych z łagodnymi i złośliwymi guzami tarczycy. Potwierdzają one znaczącą rolę p53, sFasL i apoptozy w nowotworach tarczycy. Ekspresja obu białek może być wskaźnikiem zwiększonej apoptozy i przydatna w przedoperacyjnej diagnozie guzów tarczycy.

Istnieje kilka sprzecznych doniesień o stężeniu w surowicy rozpuszczalnej formy sFasL zaangażowanej w proces apoptozy komórek tarczycy w niedoczynności tarczycy. Dotyczy to badań, w których oznaczono stężenie w surowicy sFasL w chorobie Hashimoto. Myśliwiec i wsp.^[239] nie stwierdzili istotnych różnic stężenia sFasL w grupach pacjentów z

niedoczynnością tarczycy w przebiegu choroby Hashimoto, pacjentów w eutyreozie leczonych L-tyroksyną, w grupie pacjentów z nadczynnością tarczycy w chorobie Gravesa-Basedowa oraz w eutyreozie leczonych metimazolem z grupą kontrolną. Natomiast w grupie z GD wykazano pozytywną korelację sFasL z ATG. Fountoulakis i wsp.^[121] stwierdzili, że pomiary sFasL były poniżej poziomu czułości testu zarówno u pacjentów z HT i GD oraz w grupie kontrolnej. Odmienne wyniki zaprezentowali Kandror i wsp.^[240]. Przeprowadzone przez autorów badania wykazały, że więcej niż jedna trzecia próbek surowicy pacjentów z autoimmunologiczną chorobą tarczycy w tym z przewlekłym limfocytarnym zapaleniem tarczycy i rozsiałym wolem toksycznym, posiadało podwyższone stężenie sFasL, co potwierdziło hipotezę autorów o cytotoksycznym działaniu rozpuszczalnej formy sFasL na komórki tarczycy w cAIT.

Wyniki cytowanego badania są zgodne z wynikami uzyskanymi w pracy własnej. W badaniach własnych najwyższą medianę stężenia sFasL stwierdzono w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy (0,26 ng/ml), najniższą w grupie kontrolnej (0,06 ng/ml), a w grupie z nadczynnością tarczycy mediana stężenia sFasL wyniosła 0,14 ng/ml. Zaobserwowano znamienne statystycznie wyższe stężenie sFasL w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,001$) oraz w stosunku do grupy dzieci z nadczynnością tarczycy ($p < 0,05$). Różnica stężenia sFasL w grupie dzieci z nadczynnością i w grupie kontrolnej nie była istotna statystycznie ($p > 0,05$). Znamienne statystycznie wyższe stężenia sFasL u dzieci z przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy mogą odzwierciedlać wzmożoną ekspresję Fas na tyreocytach i zachodzącą tam apoptozę, w której pośredniczy układ Fas/sFasL, prowadząc w efekcie do destrukcji tkanki tarczycy.

W grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy w przebiegu autoimmunologicznego zapalenia tarczycy stężenie sFasL korelowało dodatnio ze stężeniem OPG, ($r = 0,72$; $p < 0,05$), co może sugerować, że w chorobie Hashimoto jednocześnie zachodzi proces apoptozy oraz hamowania resorpcji kości, chroniący przed osteoporozą oraz procesem kalcyfikacji naczyń. Natomiast stwierdzona dodatnia korelacja sFasL z TNF- α w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy manifestującą się w chorobie Gravesa-Basedowa ($r = 0,54$; $p < 0,05$) może potwierdzać jednocześnie zachodzący proces stymulacji i apoptozy.

W przedstawionej pracy nie zaobserwowano korelacji sFasL z wykładnikami hormonalnej czynności tarczycy TSH, fT3, fT4 oraz markerami odpowiedzi humoralnej ATG, ATPO i TRAb. Wykazano dodatnią korelację sFasL z BMI-SDS w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy ($r = 0,460$; $p < 0,05$).

Analiza krzywych ROC wykazała, że sFasL jest najskuteczniejszym markerem niedoczynności tarczycy u dzieci z przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy, gdyż wartość (AUC=0,897; $p = 0,001$) jest najbardziej zbliżona do jedności, z punktem odcięcia 0,104 ng/ml. Cechuje się ponadto bardzo wysoką czułością (100%) i wysoką

swoistością (73,3%). Ponadto sFasL, pozwala bardzo efektywnie różnicować grupy dzieci z niedoczynnością tarczycy i nadczynnością tarczycy (AUC=0,833; p=0,03) przy wyższej wartości punktu odcięcia 0,241 ng/ml i nieco niższej, ale nadal bardzo wysokiej czułości (94,7%) i porównywalnej swoistości (72,7%). sFasL cechuje się zatem największą z badanych cytokin zdolnością różnicowania grup dzieci z niedoczynnością tarczycy w przebiegu zapalenia tarczycy i grupą zdrową oraz obu schorzeń tarczycy u dzieci między sobą (przewlekłe autoimmunologiczne zapalenie tarczycy i choroba Gravesa-Basedowa).

Wiadomo, że zaburzenia czynności tarczycy w organizmie człowieka powodują zakłócenia obrotu kostnego, skutkując utratą masy kostnej. Hormony tarczycy wytwarzane przez tyreocyty i przechowywane formie koloidu mają wpływ na proces różnicowania się osteoklastów^[241,242]. Badania ostatnich lat nad patofizjologią układu kostnego jednoznacznie zidentyfikowały profil cytokin, które odgrywają ważną rolę w homeostazie tkanki kostnej i są niezbędne do przebudowy kości^[243,244,245]. Należą do nich osteoprotegeryna, RANK - receptor aktywujący jądrowy czynnik kappaB i jego ligand RANKL. RANKL produkowany przez osteoblasty wiąże się z receptorem RANK na powierzchni osteoklastów, zapoczątkowując kaskadę reakcji, które prowadzą do resorpcji kości^[246]. Osteoprotegeryna, członek z rodziny TNFR, działa jako rozpuszczalny receptor zarówno dla liganda RANKL jak i liganda związanego z TNF indukującego apoptozę TRAIL. OPG wykazuje działanie ochronne i hamujące proces osteoklastogenezy. Nadekspresja OPG u transgenicznych myszy skutkuje osteopetrozą a uszkodzenie genu *OPG* powoduje osteoporozę oraz wzrost liczby dojrzałych osteoklastów^[247].

Hofbauer i wsp.^[175] w swoich badaniach wykazali, że RANKL i OPG są produkowane w tarczycy przez komórki pęcherzykowe i regulacja ich wydzielania jest indukowana przez cytokiny IL-1 β , TNF- α i TSH, a synteza ta może być modulowana przez proces autoimmunizacji tarczycy^[175].

Układ OPG/RANK/RANKL jako molekularna triada wywiera dominujący wpływ na kości, układ odpornościowy i system naczyniowy, a także odgrywa ważną rolę w wielu chorobach nienowotworowych, takich jak osteoporoza, choroby Pageta, zapalenie stawów i choroby układu krążenia^[248].

Niektóre badania sugerują, że OPG działa również jako ważna cytokina regulująca, mająca wpływ na zmiany miażdżycowe w układzie naczyniowym^[249]. Badania populacji ludzi dorosłych wykazały, że OPG może być markerem ryzyka sercowo-naczyniowego^[250].

W prospektywnym badaniu Browner i wsp.^[251] w grupie prawie 500 kobiet, wykazane wysokie wartości OPG wiązały się ze zwiększoną śmiertelnością sercowo-naczyniową.

W innym badaniu, autorzy Jono i wsp.^[252] stwierdzili związek między poziomem OPG oraz stopniem nasilenia choroby wieńcowej u pacjentów poddawanych koronarografii. W kilku niezależnych ośrodkach stwierdzono, że jawna niedoczynność tarczycy oraz

subkliniczna niedoczynność tarczycy są związane ze zwiększonym ryzykiem sercowo-naczyniowym^[253,254].

Nagasaki i wsp.^[179] wykazali, że stężenie OPG w osoczu wzrasta znacząco w niedoczynności tarczycy i zmniejsza się wyraźnie po zastosowaniu leczenia L-tyroksyną. Podobne wnioski przedstawili w swej pracy Guang-da i wsp.^[255], którzy odnotowali znacznie wyższe stężeniem OPG w jawnej i subklinicznej niedoczynności tarczycy przed leczeniem w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,01$). Po normalizacji czynności tarczycy, poziom OPG w obu grupach uległ znacznemu obniżeniu ($p < 0,01$), a zmiany stężenia OPG wykazały znaczącą dodatnią korelację ze zmianami TSH ($p < 0,05$) oraz ujemną korelację ze zmianami w obrębie śródbłonna naczyń ($p < 0,01$) u pacjentów z niedoczynnością tarczycy w trakcie leczenia. Wymienieni autorzy w pracach swych sugerują, że podwyższone stężenie OPG może być związane ze zwiększonym ryzykiem chorób naczyniowych u pacjentów z niedoczynnością tarczycy. Wspólne działanie triady cząsteczek OPG/RANK/RANKL może więc stanowić most łączący metabolizm kości, biologię naczyń i odporność immunologiczną. Ponadto, OPG jest zdolna do wiązania TRAIL, którego ekspresję stwierdzono w limfocytach T, komórkach śródbłonna i komórkach mięśni gładkich, wywierając działanie ochronne poprzez zapobieganie apoptozie naciekających komórek zapalnych w miażdżycy tętnic i chorobach sercowo-naczyniowych^[256].

Olesen i wsp.^[257] sugerują, że OPG może odgrywać szczególną rolę w miażdżycy i zwapnieniu tętnic wieńcowych pacjentów chorych na cukrzycę. Anand i wsp.^[258] w swoim badaniu stwierdzili, że podwyższone wartości osteoprotegeryny, mogą być wykorzystywane jako marker predykcyjny, służący do identyfikacji pacjentów z wysokim ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych w przebiegu cukrzycy typu 2.

Prowadzone badania *in vitro* wykazały, że OPG promuje przeżycie komórek nowotworowych. Uważa się, że bezpośredni ochronny wpływ OPG na komórki nowotworowe jest związany z omawianym poprzednio łączeniem się z TRAIL a tym samym zapobieganiem i hamowaniem indukowanej przez TRAIL aktywacji szlaków apoptotycznych w komórkach nowotworowych^[259]. Opisaną zależność potwierdzono w badaniach *in vitro* komórek nowotworowych tarczycy^[176]. Inne badania wykazały, że OPG promuje również przeżycie linii komórkowych raka piersi, prostaty i jelita^[260,261,262]. Osteoprotegeryna wywiera również proangiogeny wpływ na komórki śródbłonna naczyń ale mechanizmy te nie są jeszcze w pełni poznane^[263].

W pracy Heymann i wsp.^[176] wykazano po raz pierwszy ekspresję OPG/RANK/RANKL w patologicznych komórkach pęcherzykowych tarczycy i w mikrośrodowisku przerzutów do węzłów chłonnych. Tak więc triada cytokin OPG/RANK/RANKL może odgrywać rolę w patogenezie guzów pęcherzykowych tarczycy.

Innym stanem, w którym obserwuje się utratę masy kostnej jest nadczynność tarczycy. Wzrost stężeń OPG u chorych z nadczynnością tarczycy może odzwierciedlać jej regulacyjny mechanizm zapobiegający przed nasilonym obrotem kostnym, który jest indukowany przez nadczynność tarczycy^[202,264,265]. Hipotezę tę wydaje się popierać fakt, że istnieje wyraźna korelacja pomiędzy OPG a markerami obrotu kostnego^[177]. Kilka ostatnich publikacji podaje, że OPG i RANKL mogą być zaangażowane w powiązanie pomiędzy czynnością hormonalną tarczycy i metabolizmem kostnym w patologii tarczycy. Tak więc, towarzyszący nadczynności wzrost stężenia OPG powiązany jest z nadmiarem hormonów tarczycy^[177]. Ponadto mRNA OPG występuje bardziej obficie w próbkach chirurgicznych tarczycy w chorobie Gravesa-Basedowa w porównaniu z innymi chorobami tarczycy^[175]. Poziom OPG również koreluje z wartościami biomarkerów metabolizmu kostnego podczas leczenia przeciwtarczycowego pacjentów z chorobą Gravesa^[266].

W pracy Mikosch i wsp.^[267] wykazano, że hamująca terapia hormonem tarczycy u mężczyzn ze zróżnicowanym rakiem tarczycy pobudza proces degradacji kostnej, w następstwie wystąpienia zaburzonej równowagi OPG/RANKL.

W przedstawionej pracy własnej zostało oznaczone stężenie osteoprotegeryny, rozpuszczalnej formy liganda receptora aktywującego czynnik jądrowy kappa B sRANKL i związanego z TNF liganda indukującego apoptozę TRAIL w surowicy krwi dzieci chorych na autoimmunologiczną chorobę tarczycy, w tym w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy wywołanej na skutek przewlekłego autoimmunologicznego zapalenia tarczycy w przebiegu choroby Hashimoto i w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy w chorobie Gravesa-Basedowa, w porównaniu do grupy zdrowych dzieci w eutyreozie.

Stężenie OPG w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy mieściło się w zakresie od 1,17 (minimum) do 8,3 pmol/l (maksimum). W grupie z niedoczynnością tarczycy stężenie OPG wynosiło od 1,6 do 6,37 pmol/l, a w grupie kontrolnej od 1,46 do 5,51 pmol/l. Najliczniejszym przedziałem w grupie z nadczynnością tarczycy był przedział (2-3 pmol/l), (n=6; 27,3%). Natomiast w grupach dzieci z niedoczynnością tarczycy i w kontrolnej był to przedział (3-4 pmol/l), (kolejno n=8; 36,4% i n=7; 35%). Najwyższe średnie stężenie OPG stwierdzono w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy (4,48 pmol/l), najniższe średnie stężenie w grupie kontrolnej (3,02 pmol/l). W grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy średnia stężenia OPG wyniosła 3,79 pmol/l. W pracy własnej nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic stężenia OPG w zależności od płci zarówno w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy, niedoczynnością tarczycy jak i w grupie kontrolnej.

Badania wielu autorów wskazują, że OPG pełni istotną rolę nie tylko w chorobach metabolicznych kości, ale również w innych stanach patologicznych^[268,269]. Najwięcej badań dotyczy osób dorosłych. Badania prowadzone w ciągu ostatnich lat nad osteoprotegeryną w populacji dziecięcej, nie są zbyt liczne. Nie można wyników badań dotyczących stężenia

OPG u ludzi dorosłych bezpośrednio odnieść do populacji dzieci i młodzieży. W badaniach Masi i wsp. wykazano, że stężenie OPG w populacji dziecięcej jest znacząco niższe niż u dorosłych^[270]. Zbliżone wyniki oznaczeń OPG u dzieci w odniesieniu do grupy kontrolnej potwierdzają badania innych autorów^[271,272]. Jakkolwiek są doniesienia o znacznie wyższych wartościach. Rossio i wsp. odnotowali w grupie kontrolnej stężenie OPG $21,35 \pm 2,05$ pmol/l^[273]. Brakuje wciąż danych określających wartości referencyjne dla populacji dzieci i młodzieży, uwzględniających dynamiczny metabolizm tkanki kostnej w wieku rozwojowym.

W populacji ludzi dorosłych badania dotyczące OPG przedstawili w kohortowym badaniu obejmującym 1134 zdrowych kobiet i mężczyzn w wieku od 19 do 81 lat i starszych Kudlacek i wsp. Oznaczyli oni średnie stężenie OPG, które w całej przebadanej populacji wynosiło $2,54 \pm 2,57$ pmol/l. Autorzy wykazali znaczący wzrost stężenia OPG wraz z wiekiem. U kobiet poniżej 30 lat od $2,25 \pm 1,05$ pmol/l, oraz u kobiet starszych po menopauzie w wieku 61-70 lat $3,48 \pm 3,15$ pmol/l, aż do $11,3 \pm 5$ pmol/l u kobiet powyżej 81 lat. W populacji mężczyzn wyniki kształtowały się podobnie od $2,03 \pm 1,31$ pmol/l u młodszych mężczyzn, do $11,3 \pm 0,39$ pmol/l powyżej 80 lat^[274].

W literaturze opisującej rolę osteoprotegeryny w populacji dziecięcej ciekawe badania przeprowadził Buzi^[123]. Przebadał 88 dzieci, określając stężenie OPG i RANKL w surowicy. Badana populacja obejmowała dzieci zdrowe, z młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów, chorobą Turnera oraz przedwczesnym dojrzewaniem płciowym. Średnie stężenie w grupie dzieci zdrowych wynosiło $4,05 \pm 1,63$ pmol/l. Wartości OPG u dzieci młodszych od 1-4 lat ($5,87 \pm 2,22$ pmol/l), były znamienne wyższe niż u dzieci starszych w wieku 4-14 lat ($3,55 \pm 0,97$ pmol/l). W wyniku obserwacji stwierdzono zbliżone wartości OPG u dzieci starszych do wartości stężeń OPG oznaczanych u dorosłych. W przedstawionym opracowaniu w badaniu własnym nie stwierdzono związku między stężeniem OPG a wiekiem badanych dzieci.

W dostępnym piśmiennictwie badania OPG w populacji dziecięcej przeważnie obejmują małe grupy dzieci, bardzo zróżnicowane pod względem wieku, płci oraz diagnozy. Dotyczą różnych schorzeń wieku dziecięcego takich jak: cukrzyca typu 1, nerwiak zarodkowy, choroba Kawasaki, histiocytoza z komórek Langerhansa, młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów, zespół Turnera, atrezja dróg żółciowych^[273,275,276,277,278,279].

W pracy Galluzzi i wsp.^[275] przeprowadzonej na grupie 26 dzieci z rozpoznaną cukrzycą typu 1 stwierdzili wyższy poziom OPG $3,58 \pm 0,72$ pmol/l w porównaniu z grupą kontrolną 45 zdrowych dzieci $2,01 \pm 0,6$ pmol oraz korelację OPG z ilością masy kostnej i HBA1c. Autorzy stwierdzają, że OPG może być markerem zmniejszonej masy kostnej oraz uszkodzenia naczyń u dzieci cierpiących na cukrzycę typu 1.

W badaniu Simonini i wsp.^[277] zaobserwowali u 58 dzieci z chorobą Kawasaki znamienne wyższe stężenie OPG ($5,05$ pmol/l) niż u 40 dzieci zdrowych ($2,0$ pmol/l) oraz

pozostałych dzieci z grup porównawczych: wybranych 30 dzieci gorączkujących (4,03 pmol/l) oraz 18 z młodzieńczym toczniem rumieniowatym (3,42 pmol/l).

U dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna, w badaniu Sylvestra średnie stężenie OPG wyniosło $4,24 \pm 1,74$ pmol/l i było wyższe od $3,38 \pm 0,83$ pmol/l w grupie kontrolnej^[272]. Wyniki te w większości pokrywają się z doniesieniami innych autorów stwierdzających podobną zależność stężenia OPG. Rosso i wsp.^[273] odnotowali wyższy poziom OPG w grupie 18 dzieci z histiocytozą komórek Langerhansa, w porównaniu do grupy kontrolnej 20 dzieci. Stężenie OPG przed włączeniem leczenia wyniosło $95,0 \pm 12,5$ pmol/l a $21,35 \pm 2,05$ pmol/l w grupie kontrolnej. Wyższe wartości korelowały z podwyższonym stężeniem TNF- α i innych markerów stanu zapalnego. Poziom OPG był niższy u dzieci z litycznymi zmianami w kościach.

Natomiast Granchi i wsp.^[276] w grupie 54 pacjentów z nerwiakiem zarodkowym stwierdziła statystycznie niższy poziom OPG w porównaniu z grupą kontrolną 35 dzieci niezależnie od stopnia zaawansowania choroby.

Jedna z niewielu prac badających rolę osteoprotegeryny z udziałem większej grupy dzieci i młodzieży wykonana została w 2008 roku przez Gannage Yared na grupie 106 dzieci. W badaniu tym nie wykazano różnicy znamiennej statystycznie pomiędzy stężeniem OPG w populacji dzieci otyłych (5,17 pmol/l) a grupą kontrolną (4,96 pmol/l). W populacji dzieci otyłych autorzy stwierdzili brak powiązania OPG z BMI, poziomem cholesterolu, triglicerydów i HDL. Stwierdzono natomiast pozytywną korelację OPG z HOMA-IR i CRP^[280].

W pracy własnej stwierdzono korelacje stężenia osteoprotegeryny z cytokinami charakteryzującymi stan zapalny i cytokinami proapoptycznymi. W grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy OPG korelowała dodatnio z IL-1 β ($r=0,44$; $p<0,05$) i sFasL ($r=0,72$; $p<0,05$) oraz z ligandem TRAIL ($r=0,54$; $p<0,01$). Prawdopodobnie potwierdza to powiązanie zapalenia tarczycy z procesem apoptozy stymulowanym m. in. przez IL-1 β w przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniu tarczycy. Natomiast w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy stężenie OPG dodatnio korelowało z IL-6 ($r=0,51$; $p<0,05$) cytokiną stymulującą proces resorpcji kości oraz z TNF- α ($r=0,69$; $p<0,01$) i z rozpuszczalnym ligandem receptora sRANKL ($r=0,54$; $p<0,01$) czyli z cytokiną pobudzającą proces osteoklastogenezy. Wszystkie stwierdzone istotne korelacje mają dodatni charakter, co sugeruje ich synergistyczne działanie w nadczynności i niedoczynności tarczycy i jednoczesny wzrost stężeń w obu stanach funkcji tarczycy. Nie stwierdzono żadnej wspólnej, istotnej korelacji w obu przeciwstawnych klinicznie grupach pacjentów. Również nie stwierdzono korelacji OPG ze stanem odżywienia (BMI, BMI-SDS, wskaźnik Cole'a) parametrami hormonalnej czynności tarczycy TSH, FT4, FT3 i wykładnikami immunologicznymi ATG, ATPO, TRAb w badanych grupach dzieci.

Ważnym celem badania własnego było wykazanie różnicy stężenia OPG w surowicy krwi pomiędzy badanymi grupami dzieci z nadczynnością tarczycy, niedoczynnością oraz grupą kontrolną. Stwierdzono znamienne statystycznie wyższe stężenie OPG w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy (średnia 4,48 pmol/l) w porównaniu z grupą kontrolną (średnia 3,02 pmol/l), ($p < 0,01$). Nie stwierdzono istotnych różnic stężenia OPG między grupą dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy (średnia 3,79 pmol/l), ($p > 0,05$) oraz niedoczynnością tarczycy i kontrolną ($p > 0,05$). Znamienne wyższe stężenie OPG w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy w przebiegu GD wskazywać może na osteoprotekcyjne działanie OPG w porównaniu do grupy kontrolnej.

Analiza krzywych ROC wykazała, że OPG jest skutecznym markerem nadczynności tarczycy u dzieci. Różnicuje on grupę dzieci z nadczynnością tarczycy w chorobie Gravesa-Basedowa z dziećmi zdrowymi w eutyreozy i bez objawów immunologicznych choroby tarczycy (AUC=0,716; $p=0,017$), z czułością 54,5% i swoistością 90%, w punkcie odcięcia 4,54 pmol/l. Prawdopodobnie im wyższe stężenie OPG w surowicy to z większą pewnością można stwierdzić nadczynność tarczycy w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa u dzieci.

RANKL wykazuje ekspresję na powierzchni wielu komórek, przede wszystkim osteoblastów. Najczęściej występuje w formie związanej z komórką, chociaż istnieje również w postaci rozpuszczalnej, utworzonej za pośrednictwem proteazy. RANK przez wiązanie z RANKL promuje różnicowanie osteoklastów, aktywację i przeżycie w procesie budowy kości. Dane eksperymentalne wykazały, że rolą układu RANK/RANKL jest faworyzowanie osteoklastogenezy in vitro oraz indukowanie osteoporozy i hiperkalcemii warunkach in vivo. Ponadto myszy pozbawione RANKL wykazują patologiczny wzrost masy kostnej oraz brak dojrzałych osteoklastów^[281,282].

W badaniach własnych stężenie sRANKL w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy kształtowało się od 0 do 2,1 pmol/l (maksimum) oraz w takim samym zakresie w grupie z niedoczynnością tarczycy: od 0 do 2,1 pmol/l (również maksimum). Natomiast w grupie kontrolnej zakres stężeń sRANKL był niższy i wynosił od 0 do 1,21 pmol/l. Najwyższą medianę stężenia sRANKL stwierdzono w grupie z niedoczynnością tarczycy (0,23 pmol/l), najniższą w grupie kontrolnej (0,09 pmol/l), a w grupie z nadczynnością tarczycy mediana stężenia sRANKL wyniosła 0,2 pmol/l. Stwierdzono istotną różnicę stężenia sRANKL w zależności od płci pomiędzy dziewczynkami i chłopcami w grupie kontrolnej. Zaobserwowano istotnie wyższe stężenia u dziewcząt (średnio 0,43 pmol/l) w porównaniu do chłopców (średnio 0,08 pmol/l; $p=0,015$).

Nie stwierdzono istotnej różnicy stężenia sRANKL między badanymi grupami dzieci (test Kruskal'a-Walis'a; $p=0,33$), co nie potwierdza możliwości wykorzystania tej cytokiny jako parametru diagnostycznego w różnicowaniu autoimmunologicznej choroby tarczycy u dzieci ze zdrowymi dziećmi. Stwierdzono następujące korelacje sRANKL z markerami obrotu

obrotu kostnego w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy: sRANKL z OPG ($r=0,54$; $p<0,01$), sRANKL i TNF- α ($r=0,67$; $p<0,0$) oraz sRANKL i ATPO ($r=0,46$; $p<0,05$). Wśród dzieci z niedoczynnością tarczycy stężenie sRANKL korelowało dodatnio z cytokiną proapoptotyczną TRAIL ($r=0,53$; $p<0,05$) oraz hormonami fT3 ($r=0,52$; $p<0,05$) i z fT4 ($r=0,53$; $p<0,05$) oraz ujemnie z TSH ($r=-0,51$; $p<0,05$). W grupie kontrolnej stwierdzono korelację sRANKL z sFasL ($r=0,61$; $p<0,01$) i dodatnią sRANKL z wiekiem pacjentów ($r=0,47$; $p<0,05$). Profile korelacji stężenia sRANKL w obu grupach badanych dobrze charakteryzują te dwa odmienne klinicznie schorzenia tarczycy u dzieci. Stwierdzone istotne korelacje dodatnie, sugerują ich synergistyczne działanie i jednoczesny wzrost ich stężeń.

Stężenie TRAIL w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy kształtowało się w zakresie od 52,31 do 215,34 pg/ml (maksimum), w grupie z niedoczynnością tarczycy w zakresie: 5,9 – 208,85 pg/ml, natomiast w grupie kontrolnej od 1,04 (minimum) do 194,59 pg/ml. Najwyższą medianę stężenia TRAIL stwierdzono w grupie z nadczynnością tarczycy (88,06 pg/ml), najniższą w grupie kontrolnej (60,66 pg/ml), a w grupie z niedoczynnością tarczycy mediana stężenia TRAIL wyniosła 62,43 pg/ml. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic stężenia TRAIL w zależności od płci zarówno w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy, niedoczynnością tarczycy jak i w grupie kontrolnej.

W grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy wykazano korelację TRAIL z markerami obrotu kostnego sRANKL ($r=0,53$; $p<0,05$) i jego rozpuszczalnym receptorem OPG ($r=0,54$; $p<0,01$) oraz hormonami tarczycy fT3 ($r=0,49$; $p<0,05$) i wspólną z nadczynnością korelację TRAIL i fT4 ($r=0,44$; $p<0,05$). W grupie kontrolnej stwierdzono natomiast ujemną korelację z przeciwciałami ATPO ($r=-0,5$; $p<0,05$).

Zaobserwowano istotnie statystycznie wyższe stężenie TRAIL w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy (mediana 88,06 pg/ml) w porównaniu z grupą z niedoczynnością tarczycy (mediana 62,43 pg/ml), ($p<0,05$) i kontrolną (mediana 60,66 pg/ml) ($p<0,05$). Nie stwierdzono istotnej różnicy stężenia TRAIL między grupą z niedoczynnością tarczycy a kontrolną ($p>0,05$). W grupie dzieci z nadczynnością tarczycy stężenie TRAIL korelowało dodatnio ze stężeniem TNF- α ($r=0,43$; $p<0,05$) oraz z hormonami tarczycy fT4 ($r=0,48$; $p<0,05$) i przeciwciałami TRAb ($r=0,50$; $p<0,01$). Wskazuje to na istotną aktywność ścieżki apoptozy zależnej od TRAIL u dzieci z nadczynnością tarczycy w przebiegu GD. Występujące w nadczynności tarczycy u dzieci z chorobą Gravesa-Basedowa korelacje TRAIL mogą potwierdzać zachodzący jednocześnie proces apoptozy i stymulacji gruczołu tarczowego.

Analiza krzywych ROC wykazała, że TRAIL jest skutecznym markerem nadczynności tarczycy u dzieci. Różnicuje on grupę dzieci z nadczynnością tarczycy w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa z dziećmi zdrowymi w eutyreozie i bez objawów immunologicznej choroby tarczycy (AUC=0,72; $p=0,015$) z czułością 95,5% i swoistością 50% w punkcie

odcięcia 54,6 pg/ml. Ponadto TRAIL można uznać markerem nadczynności tarczycy, który pozwala na skuteczne różnicowanie grup dzieci z chorobą Gravesa-Basedowa i dzieci z niedoczynnością tarczycy w przebiegu przewlekłego autoimmunologicznego zapalenia tarczycy (AUC=0,731; p=0,009), z czułością 95,5% i swoistością 45,5% w punkcie odcięcia 54,2 pg/ml. Stężenie TRAIL jest podwyższone w nadczynności tarczycy u dzieci.

Podwyższony poziom cytokin w surowicy dzieci z AITD odzwierciedla aktywację i wzajemne oddziaływanie odpowiedzi Th1 i Th2, które mogą być związane z długotrwałym stanem zapalnym oraz procesem destrukcyjnym gruczołu tarczowego. Na podstawie zebranych danych można stwierdzić, że hormonalnie i klinicznie przeciwstawne obrazy AITD u pacjentów pediatrycznych charakteryzują się występowaniem zróżnicowanych profili cytokin prozapalnych oraz czynników proapoptotycznych i antyapoptotycznych. Powyższe obserwacje wydają się wskazywać na istotną rolę badanych cytokin w patogenezie obu przeciwstawnych klinicznie schorzeń tarczycy u dzieci. Pomimo coraz większej wiedzy i stale prowadzonych badań w wielu krajowych i zagranicznych ośrodkach, mechanizm działania i patogenetyczna rola cytokin w AITD u dzieci nadal pozostają nie w pełni poznane.

6. WNIOSKI

1. W fazie niedoczynnej przewlekłego autoimmunologicznego zapalenia tarczycy stwierdza się wyższe stężenie IL-1 β , aniżeli w fazie nadczynnej choroby Gravesa-Basedowa u dzieci.
2. Istotnie podwyższone wartości TRAIL u pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa wskazują, że zarówno stymulacja (z udziałem TRAb), jak i apoptoza (z udziałem TRAIL) zachodzą jednocześnie w nadczynności tarczycy w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa u dzieci.
3. W grupie dzieci z nadczynnością tarczycy w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa obserwuje się znamienne wyższe stężenie OPG, w porównaniu do grupy kontrolnej i grupy dzieci z przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy.
4. Wartości stężeń cytokin IL-1 β , TNF α , sFasL, TRAIL i OPG w oparciu o analizę ROC są parametrami diagnostycznymi, różnicującymi dzieci z autoimmunologiczną chorobą tarczycy z grupą dzieci zdrowych. sFasL jest szczególnym markerem, najlepiej różnicującym (największa czułość i swoistość) grupę dzieci z niedoczynnością tarczycy w przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniu tarczycy, z grupą dzieci z nadczynnością tarczycy w chorobie Gravesa-Basedowa oraz z dziećmi zdrowymi w eutyreozie.
5. Korelacje cytokin IL-1 β , IL-6, TNF- α , TRAIL, sFasL, RANKL i OPG pomiędzy sobą oraz z wiekiem, stanem odżywienia, parametrami hormonalnej funkcji tarczycy TSH, fT4, fT3 i odpowiedzi immunologicznej TRAb, ATG i ATPO charakteryzują badane grupy dzieci i są powiązane z określonym stanem nadczynności i niedoczynności tarczycy u dzieci. Ponadto odmienne profile korelacji pozwalają różnicować te stany między sobą oraz ze zdrową grupą kontrolną.
6. Nie obserwuje się istotnych statystycznie różnic stężenia cytokin IL-6, TNF α , sRANKL pomiędzy przeciwstawnymi klinicznie i hormonalnie grupami dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy oraz grupą dzieci zdrowych.

7. STRESZCZENIE

Patogeneza autoimmunologicznej choroby tarczycy (AITD), prowadzącej w konsekwencji do uszkodzenia tarczycy jest wieloczynnikowym procesem, w którym ważną rolę odgrywają podatność genetyczna oraz czynniki środowiskowe. Autoimmunologiczne zaburzenia funkcji tarczycy tworzą obraz, na który składają się dwa przeciwstawne klinicznie i hormonalnie stany funkcji tarczycy: przewlekłe autoimmunologiczne zapalenie tarczycy (cAIT), objawiające się niedoczynnością tarczycy oraz choroba Gravesa-Basedowa (GD), charakteryzująca się nadczynnością tarczycy. Rozwój AITD następuje w wyniku utraty tolerancji immunologicznej i reaktywności na autoantygeny tarczycy, co doprowadza do infiltracji gruczołu przez limfocyty T oraz limfocyty B, które produkują charakterystyczne przeciwciała. Ponadto w cAIT limfocyty T indukują apoptozę komórek pęcherzykowych tarczycy, prowadząc do destrukcji gruczołu. Komórki Th1 produkują cytokiny prozapalne IL-2, IFN- γ , TNF α , IL-1 β , co prowadzi do aktywacji makrofagów i efektów cytotoksyczności. Natomiast Th2 wydzielają cytokiny IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, które mogą hamować produkcję cytokin Th1, ale głównie stymulują limfocyty B do produkcji przeciwciał i aktywacji cząsteczek antyapoptotycznych. OPG i RANKL, cytokiny z rodziny TNF regulujące osteoklastogenezę, mają istotne znaczenie w chorobach o podłożu autoimmunologicznym. OPG również wiąże się z TRAIL, w ten sposób regulując apoptozę komórek tarczycy.

Celem pracy była ocena stężenia wybranych czynników prozapalnych IL-1 β , IL-6 i cytokin proapoptotycznych TNF- α , sFasL, TRAIL, sRANKL i antyapoptotycznej OPG w dwóch przeciwstawnych klinicznie i hormonalnie schorzeniach tarczycy, w grupach dzieci z autoimmunologiczną chorobą tarczycy.

Materiał i metody: Badaniem objęto 64 dzieci, w tym 44 nowo zdiagnozowanych, nieleczonych dzieci z cAIT i GD: 22 pacjentów z niedoczynnością tarczycy w wieku od 6 do 16 lat, 18 dziewczynek (81,8%) i 4 chłopców (18,2%) oraz 22 pacjentów z nadczynnością tarczycy w wieku od 3 do 18 lat, w tym 16 dziewczynek (72,7%) i 6 chłopców (27,3%). Grupę kontrolną stanowiło 20 dzieci zdrowych dzieci – 11 dziewczynek (55%) i 9 chłopców (45%) w wieku od 2 do 18 lat. Grupy te nie różniły się rozkładem płci. U wszystkich dzieci oznaczono hormony tarczycy TSH, fT4, fT3, przeciwciała ATG, ATPO, TRAb oraz zmierzono masę ciała i wzrost, obliczono wskaźniki BMI, BMI-SDS i wskaźnik Cole'a. Stężenia cytokin w grupach pacjentów z cAIT, GD i kontrolnej oceniano na początku choroby przed wprowadzeniem leczenia. Zestawy stosowane do oznaczania stężenia cytokin w surowicy krwi (Biomedica, BenderMedSystem) były oparte na technice immunoenzymatycznej ELISA. Do pomiaru absorbancji użyto czytnika do mikropłytek Elx 800 firmy Bio-Tek Instruments. Stężenie: IL-1 β , IL-6, TNF- α , sFasL, TRAIL, wyrażano w pg/ml, zaś OPG i sRANKL w pmol/l. Podczas analizy wyników wykorzystano elementy statystyki opisowej, testy nieparametryczne oraz

krzywe ROC. Za znamienne statystycznie przyjmowano wyniki testowania, dla których poziom istotności był mniejszy lub równy 0,05.

Wyniki i wnioski. Stwierdzono brak istotnych różnic między dziewczynkami i chłopcami w grupach dzieci z niedoczynnością i nadczynnością tarczycy pod względem badanych parametrów (wiek, BMI, BM-SDS, wskaźnik Cole'a, TSH, fT4, fT3, TRAb, ATG, ATPO, IL-6, TNF- α , IL-1 β , TRAIL, OPG, sRANK, sFasL).

Nie stwierdzono istotnych różnic wieku oraz parametrów stanu odżywienia: BMI, BMI-SDS i wskaźnika Cole'a między grupami z nadczynnością, niedoczynnością tarczycy i grupą kontrolną (kolejno test Kruskal'a-Wallis'a $p=0,31$, $p=0,8$, $p=0,31$ i ANOVA dla wskaźnika Cole'a $p=0,15$).

W badaniu stwierdzono istotne statystycznie różnice ($p<0,001$) wszystkich parametrów hormonalnej funkcji tarczycy: TSH, fT4, fT3 i wykładników immunologicznych: TRAb, ATG i ATPO między badanymi grupami dzieci. Wszystkie z powyższych obserwowanych różnic były bezpośrednio związane z przeciwstawnymi stanami hormonalnymi nadczynności i niedoczynności tarczycy.

Badane grupy dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy oraz kontrolna nie różniły się istotnie między sobą stężeniami cytokin: IL-6, TNF- α i sRANKL (kolejno test Kruskal'a-Wallis'a: $p=0,48$, $p=0,067$, $p=0,33$).

W surowicy krwi dzieci z niedoczynnością tarczycy w cAIT stwierdzono znamienne wyższe wartości stężenia IL-1 β (mediana 2,16 pg/ml) w porównaniu z grupą dzieci z nadczynnością tarczycy w GD (mediana 1,39 pg/ml); ($p<0,01$) i z grupą kontrolną (mediana 1,88 pg/ml); ($p<0,05$) oraz znamienne wyższe stężenia sFasL (mediana 0,26 ng/ml) w porównaniu do grupy dzieci z nadczynnością tarczycy (mediana 0,14 ng/ml; $p<0,05$) i do grupy kontrolnej (mediana 0,06 ng/ml; $p<0,001$).

W grupie dzieci z nadczynnością tarczycy w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa stwierdzono znamienne wyższe stężenie cytokin: TRAIL (mediana 88,06 pg/ml) w porównaniu do grupy z niedoczynnością tarczycy (mediana 62,43 pg/ml; $p<0,05$) i do grupy kontrolnej (mediana 60,66 pg/ml; $p<0,05$) oraz znamienne wyższe stężenie OPG (średnia 4,48 pmol/l) w porównaniu z grupą kontrolną (średnia 3,02 pmol/l; $p<0,01$).

Powyższe obserwacje wydają się wskazywać na istotną rolę badanych cytokin prozapalnych, proapoptotycznych i antyapoptotycznych w patogenezie obu przeciwstawnych klinicznie schorzeń tarczycy u dzieci.

Wyniki analizy krzywych ROC pozwoliły określić przydatność stężenia badanych cytokin jako parametru diagnostycznego w AITD, w celu różnicowania dzieci z autoimmunologiczną chorobą tarczycy od dzieci zdrowych. Cytokiny IL-1 β (AUC=0,77; $p=0,003$), TNF- α (AUC=0,691; $p=0,034$) i sFasL (AUC=0,897; $p=0,001$) mogą być uznane markerami różnicującymi grupę dzieci z przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniem

tarczycy z dziećmi zdrowymi w stanie eutyreozy z czułością kolejno: 59,1%, 54,5% i 100% oraz swoistością kolejno: 95%, 85% i 73,3%. Stężenia wszystkich trzech wymienionych markerów rosną w niedoczynności tarczycy. Cytokiny TRAIL (AUC=0,72; p=0,015) i OPG (AUC=0,716; p=0,017) skutecznie różnicują grupę dzieci z nadczynnością tarczycy w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa z dziećmi zdrowymi z czułością kolejno: (95,5% i 54,5%) oraz swoistością kolejno: (50% i 90%). Stężenia obu markerów rosną w nadczynności tarczycy w porównaniu do dzieci zdrowych w eutyreozy. Natomiast cytokiny IL-1 β (AUC=0,773; p=0,002), sFasL (AUC=0,833; p=0,003) i TRAIL (AUC=0,731; p=0,009) mogą być markerami najlepiej różnicującymi grupę dzieci z niedoczynnością tarczycy w przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniu tarczycy z grupą dzieci z nadczynnością tarczycy w chorobie Gravesa-Basedowa z czułością (kolejno 72,7%, 94,7% i 95,5%) oraz swoistością (kolejno: 86,4%, 72,7% i 45,5%). Cytokiny te różnicują skutecznie oba przeciwstawne klinicznie stany funkcji tarczycy. Ponadto sFasL, zidentyfikowany wcześniej również jako marker niedoczynności tarczycy, pozwala bardzo efektywnie różnicować grupy dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy (AUC=0,833; p=0,03 vs. AUC=0,897, p=0,001) przy wyższej wartości punktu odcięcia (0,241 ng/ml vs. 0,104 ng/ml), nieco niższej ale nadal bardzo wysokiej czułości (94,7% vs. 100%) i porównywalnej swoistości (72,7% vs. 73,3%). Stężenie sFasL jest zatem optymalnym parametrem cechującym się największą zdolnością różnicowania dzieci z niedoczynnością tarczycy z grupą dzieci zdrowych oraz obu schorzeń tarczycy u dzieci cAIT i GD między sobą.

Przeanalizowano istotne korelacje nieparametryczne pomiędzy stężeniem badanych cytokin w trzech grupach dzieci. W grupie dzieci z nadczynnością tarczycy stwierdzono następujące istotne, dodatnie korelacje nieparametryczne badanych cytokin: TNF- α i IL-6 (r=0,62; p<0,01), TRAIL i TNF- α (r=0,43; p<0,05), OPG i TNF- α (r=0,69; p<0,01), sRANKL i TNF- α (r=0,67; p<0,01), sFasL i TNF- α (r=0,54; p<0,05), OPG i IL-6 (r=0,51; p<0,05), OPG i sRANKL (r=0,54; p<0,01). Wszystkie stwierdzone istotne korelacje mają dodatni charakter, co sugeruje ich synergistyczne działanie w nadczynności tarczycy i jednoczesny wzrost ich stężenia. Powyższy profil korelacji cytokin jest specyficzny dla grupy badanych dzieci z nadczynnością tarczycy – żadnej z powyższych istotnych korelacji nie stwierdzono w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy ani w grupie kontrolnej. W grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy stwierdzono następujące istotne, dodatnie korelacje nieparametryczne badanych cytokin: IL-1 β i TNF- α (r=0,45; p<0,05), IL-1 β i OPG (r=0,44; p<0,05), OPG i TRAIL (r=0,54; p<0,01), sRANKL i TRAIL (r=0,53; p<0,05), OPG i sFasL (r=0,72; p<0,05). Podobnie jak w grupie z nadczynnością tarczycy stwierdzono dodatnie korelacje, co sugeruje synergistyczne działania w/w cytokin w niedoczynności tarczycy – ich jednoczesny wzrost stężenia – nie stwierdzono żadnej wspólnej, istotnej korelacji w obu przeciwstawnych klinicznie grupach pacjentów.

Przeanalizowano również korelacje stężenia badanych cytokin (IL-6, TNF- α , IL-1 β , TRAIL, OPG, sRANK i sFasL) z wiekiem, stanem odżywienia (BMI, BM-SDS, wskaźnik Cole'a) oraz parametrami hormonalnymi i immunologicznymi funkcji tarczycy (stężenie TSH, fT4, fT3, TRAb, ATG i ATPO). W grupie dzieci z nadczynnością tarczycy stwierdzono następujące istotne korelacje: IL-1 β i ATPO ($r=0,47$; $p<0,05$), TRAIL i fT4 ($r=0,48$; $p<0,05$), TRAIL i TRAb ($r=0,50$; $p<0,01$), sRANKL i ATPO ($r=0,46$; $p<0,05$) oraz sFasL i BMI-SDS ($r=0,46$; $p<0,05$). W grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy stwierdzono następujące, istotne korelacje: TNF- α i ATPO ($r=0,54$; $p<0,01$), TRAIL i fT4 ($r=0,44$; $p<0,05$), TRAIL i fT3 ($r=0,49$; $p<0,05$), sRANKL i TSH ($r=-0,51$; $p<0,05$), sRANKL i fT4 ($r=0,53$; $p<0,05$) oraz sRANKL i fT3 ($r=0,52$; $p<0,05$). W grupach dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy stwierdzono jedną, wspólną istotną, dodatnią korelację: TRAIL i fT4 (w grupie z niedoczynnością tarczycy $r=0,44$; $p<0,05$). Poza tym profile korelacji różniły się i były specyficzne dla wszystkich trzech badanych grup. W grupie kontrolnej stwierdzono dwie istotne korelacje: ujemną TRAIL i ATPO ($r=-0,5$; $p<0,05$) i dodatnią korelację sRANKL i wieku pacjentów ($r=0,47$; $p<0,05$). Stwierdzone istotne korelacje w grupie kontrolnej są również specyficzne dla tej grupy i ściśle powiązane jedynie ze stanem prawidłowej czynności tarczycy.

Stwierdzone profile korelacji stężeń badanych cytokin IL-1 β , IL-6, TNF- α , TRAIL, sFasL, RANKL i OPG pomiędzy sobą oraz pomiędzy stężeniem cytokin a wiekiem, stanem odżywienia, parametrami hormonalnej funkcji tarczycy TSH, fT4, fT3 i odpowiedzi immunologicznej TRAb, ATG, ATPO dobrze charakteryzują badane grupy dzieci i są ściśle powiązane z określonym stanem czynności tarczycy u dzieci (nadczynności, niedoczynności i eutyrozy). Ponadto odmienne profile korelacji pozwalają różnicować te stany między sobą oraz ze zdrową grupą kontrolną.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że hormonalnie i klinicznie przeciwstawne obrazy AITD u pacjentów pediatrycznych charakteryzują się występowaniem zróżnicowanych profili cytokin prozapalnych oraz czynników proapoptotycznych i antyapoptotycznych. Powyższe obserwacje wydają się wskazywać na istotną rolę badanych cytokin w patogenezie obu przeciwstawnych klinicznie schorzeń tarczycy u dzieci.

8. SUMMARY

The pathogenesis of autoimmune thyroid disease (AITD), leading in consequence to damage of thyroid gland, is a multifactorial process with environmental factors and genetic susceptibility both playing important role. Autoimmune thyroid dysfunction makes up an image consisting of two opposing clinical and hormonal states of thyroid function: chronic autoimmune thyroiditis (cAIT) presenting as hypothyroidism and Graves' disease (GD), characterized by hyperthyroidism. AITD occurs as a result of loss of immunological tolerance to self-antigens and the reactivity of the thyroid gland, which leads to infiltration of the gland by T and B cells that produce specific antibodies. Moreover, T cells induce apoptosis of thyroid follicular cells in cAIT, leading to the destruction of the gland. Th1 cells produce pro-inflammatory cytokines IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , which lead to the activation of macrophages and cytotoxic effects. Th2 secrete IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, which can inhibit the production of Th1 cytokines and stimulate B cells to produce antibodies and activate synthesis of anti-apoptotic molecules. OPG and RANKL, members of TNF family regulate osteoclastogenesis as well as play a role in autoimmune diseases. Moreover, OPG binds TRAIL, thus regulating apoptosis of thyroid gland.

The aim of study was to evaluate the concentration of selected proinflammatory factors IL-1 α , IL-6, proapoptotic cytokines TNF α , sFasL, TRAIL, sRANKL and antiapoptotic cytokine OPG in two opposite clinical and hormonal thyroid diseases in the studied groups of children with autoimmune thyroid disease.

Materials and methods: The study group consisted of 64 newly diagnosed, untreated children with cAIT and GD: 22 patients with hypothyroidism from 6 to 16 years old, including 18 girls (81.8%) and 4 boys (18.2%) and 22 patients with hyperthyroidism from 3 to 18 years old, including 16 girls (72.7%) and 6 boys (27.3%). The control group consisted of 20 healthy children -11 girls (55%) and 9 boys (45%) - from 2 to 18 years old. These groups did not differ significantly in gender distribution. In all subjects we assessed thyroid hormones (TSH, fT3, fT4), thyroid antibodies (ATG ATPO, TRAb), measured weight and height, calculated BMI, BMI-SDS and Cole index. Cytokine concentrations in patients with cAIT, GD disease and control group was evaluated before treatment introduction. The kits applied to determine cytokines concentration in serum (Biomedica, BenderMerSystem) were based on ELISA technique. To measure the absorbance we used microplate reader Elx 800, Bio-Tek Instruments. Concentrations of IL-1 β IL-6, TNF- α , sFasL, TRAIL were expressed in pg/mL, whereas OPG and sRANKL in pmol/L. In analysis of the results descriptive statistics, nonparametric tests and ROC curves were used. The statistically significant test results was assumed when significance level was less than or equal to 0.05.

Results and conclusions. We found no significant differences between boys and girls in groups of children with hypothyroidism and hyperthyroidism in tested parameters (age, BMI, BMI-SDS, the Cole index, TSH, fT4, fT3, TRAb, ATG, ATPO, IL-6, TNF- α , IL-1 β , TRAIL, OPG, sRANK, sFasL).

There were no significant differences in age and nutritional status parameters: BMI, BMI-SDS and Cole index between the groups with hyperthyroidism, hypothyroidism and control (Kruskal'a-Wallis test, $p=0.31$, $p=0.8$, $p=0.31$ and ANOVA for the Cole index $p=0.15$).

The study identified statistically significant differences ($p < 0.001$) of all parameters of thyroid hormone function: (TSH, fT4, fT3), immune markers: (TRAb, ATG, ATPO) between the analyzed groups of children. All of these observed differences are directly related to the opposing states of hormonal hyperthyroidism and hypothyroidism compared to the control group.

Studied group of children with hyperthyroidism, hypothyroidism and control did not differ significantly in concentrations of cytokines: IL-6, TNF- α and sRANKL. (Kruskal'a-Wallis test: $p=0.48$, $p=0.067$, $p=0.33$, respectively).

In serum of children with hypothyroidism in the course of cAIT we found significantly higher concentrations of proinflammatory cytokine IL-1 β (median 2.16 pg/mL) compared to hyperthyroidism (median 1.39 pg/L) ($p < 0.01$) and control group (median 1.88 pg/mL) ($p < 0.05$) and significantly higher concentrations of sFasL (median 0.26 ng/mL) compared to hyperthyroidism (median 0.14 ng/mL) ($p < 0.05$) and vs. control (median 0.06 ng/mL) ($p < 0.001$).

In children with hyperthyroidism in the course of Graves' disease we found significantly higher levels of proapoptotic cytokine TRAIL (median of 88.06 pg/mL) compared to hypothyroidism (median of 62.43 pg/mL) ($p < 0.05$) and control (median 60.66 pg/mL) ($p < 0.05$) and significantly higher levels of antiapoptotic cytokine OPG (mean 4.48 pmol/L) vs. control (mean 3.02 pmol/L) ($p < 0.01$).

These observations seem to indicate importance of proinflammatory cytokines, proapoptotic and antiapoptotic factors in the pathogenesis of both opposing clinical thyroid disorders in children.

The results of ROC curve analysis enabled determination of usefulness of monitoring cytokine concentrations in order to discriminate children with autoimmune thyroid disease from healthy children. Cytokines IL-1 β (AUC=0.77, $p=0.003$), TNF- α (AUC=0.691, $p=0.034$) and sFasL (AUC=0.897, $p=0.001$) discriminated healthy and autoimmune-hypothyroid children with sensitivity of 59.1%, 54.5% 100%, respectively and specificity of 95%, 85%, and 73.3%. The concentrations of these markers increase in hypothyroidism. Cytokines TRAIL (AUC=0.72, $p=0.015$) and OPG (AUC=0.716, $p=0.017$) differentiate a group of children with hyperthyroidism in the course of Graves' disease from healthy children with sensitivity of 95.5% and 54.5% and specificity of 50% and 90%. The concentrations of both markers

increase in hyperthyroidism compared with euthyroid healthy children. However, IL-1 β (AUC=0.773, p=0.002), sFasL (AUC=0.833, p=0.003), TRAIL (AUC=0.731, p=0.009) also exhibit a potential to differentiate group of children with hypothyroidism in cAIT from group of children with hyperthyroidism in Graves' disease with sensitivity of 72.7%, 94.7%, and 95.5%, respectively and specificity of 86.4%, 72.7%, 45.5%. These cytokines differentiate clinically opposing states of thyroid function. Furthermore sFasL, previously identified as a marker of hypothyroidism, enables efficient discrimination of children with hyperthyroidism from hypothyroidism (AUC=0.833, p=0.03 vs. AUC=0.897, p=0.001) with a higher cutoff value (0.241 ng/mL vs. 0.104 ng/mL), slightly lower, but still very high sensitivity (94.7% vs. 100%) and comparable specificity (72.7% vs. 73.3%). sFasL therefore has the greatest ability to differentiate hypothyroid and healthy children, and both thyroid disorders - hyperthyroidism and hypothyroidism - among themselves.

In the study we found significant non-parametric correlation between cytokines concentrations in three groups of children. In children with hyperthyroidism we found the following significant, nonparametric positive correlations: TNF- α and IL-6 (r=0.62, p<0.01), TRAIL and TNF- α (r=0.43, p<0.05), OPG and TNF- α (r=0.69, p<0.01), sRANKL and TNF- α (r=0.67, p<0.01), sFasL and TNF- α (r=0.54, p<0.05), OPG and IL-6 (r=0.51, p<0.05), OPG and sRANKL (r=0.54, p<0.01). All identified significant correlations are positive, suggesting their synergistic effect in hyperthyroidism and a simultaneous increase of their concentration. This cytokine profile is highly specific for children with hyperthyroidism, since none of the above correlations were found in either children with hypothyroidism in cAIT or control group. In the studied group of hypothyroidism we found the following significant, positive correlation: IL-1 β and TNF- α (r=0.45, p<0.05), IL-1 β and OPG (r=0.44, p<0.05), OPG and TRAIL (r=0.54, p<0.01), TRAIL and sRANKL (r=0.53, p<0.05), OPG and sFasL (r=0.72, p<0.05). Likewise as in the group with hyperthyroidism positive correlation suggests a synergistic action of cytokines in hypothyroidism - the simultaneous increase of their concentration. Again, the observed profile of correlations is specific, there was no common significant correlation in both clinically opposite groups of children.

We also analyzed correlations of IL-6, TNF- α , IL-1 β , TRAIL, OPG, sRANK and sFasL with age, nutritional status (BMI, BMI-SDS, Cole index) and hormonal and immunological parameters (TSH, fT4, fT3, TRAb, ATG and ATPO). In children with hyperthyroidism following significant correlations were found: IL-1 β and ATPO (r=0.47, p<0.05), TRAIL and fT4 (r=0.48, p<0.05), TRAIL and TRAb (r=0.50, p<0.01), sRANKL and ATPO (r=0.46, p<0.05) and sFasL and BMI-SDS (r=0.46, p<0.05). In children with hypothyroidism following, significant correlations were found: TNF- α and ATPO (r=0.54, p<0.01), TRAIL and fT4 (r=0.44, p<0.05), and TRAIL and fT3 (r=0.49, p<0.05), sRANKL and fT4 (r=0.53, p<0.05), sRANKL and fT3 (r=0.52, p<0.05) and negative correlation sRANKL and TSH (r=-0.51,

$p < 0.05$). In children with hyperthyroidism and hypothyroidism, only one common significant positive correlations was found: TRAIL and fT4 (in the group with hypothyroidism $r = 0.44$, $p < 0.05$). In addition, the correlation profiles differ and they are specific for all three groups. The control group showed two significant correlations: negative TRAIL and ATPO ($r = -0.5$, $p < 0.05$) and a positive correlation sRANKL and age of patients ($r = 0.47$, $p < 0.05$). This significant correlations in the control group are also specific to this group and closely linked only to euthyroid state.

Observed profiles of correlation between concentrations of cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α , TRAIL, sFasL, RANKL and OPG among themselves and between cytokine levels and thyroid hormone parameters: TSH, fT4, fT3 and immune response: ATG, ATPO, TRAb characterized groups of studied children and are highly associated with specific state of thyroid gland function in children. In addition, the correlation profiles of these conditions allow to differentiate between them and the healthy control group.

Based on the obtained results it can be concluded that the hormonal and clinical AITD contradictory images in pediatric patients are characterized by different profiles of inflammatory cytokines and pro-apoptotic and anti-apoptotic factors. These observations seem to indicate the important role of cytokines in the pathogenesis of both opposing clinical thyroid disorders in children.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Mackay IR: Science, medicine, and the future: Tolerance and autoimmunity. *BMJ* 2000; 321(7253): 93-96.
2. Davidson A, Diamond B: Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 2001; 345(5): 340-350.
3. Swain M, Swain T, Mohanty BK: Autoimmune thyroid disorders - an update. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2005; 20(1): 9-17.
4. Niedziela M: Subclinical hypothyroidism: dilemmas in the treatment of children. *Journal of Endocrinological Investigation* 2007; 30(6): 529-531.
5. Michels AW, Eisenbarth GS: Immunologic endocrine disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2 Suppl 2): 226-237.
6. Weetman AP: Diseases associated with thyroid autoimmunity: explanations for the expanding spectrum. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011; 74(4): 411-418.
7. Niedziela M: Long Term Follow-Up of Hashimoto Thyroiditis. Meet the Expert Session Handouts. 49th Annual Meeting of the ESPE. *Hormone Research in Paediatrics* 2010; 74 Suppl 3.
8. Cappa M, Bizzarri C, Crea F: Autoimmune thyroid diseases in children. *J Thyroid Res* 2010; 2011: doi 10.4061/2011/675703.
9. Setian NS: Hypothyroidism in children: diagnosis and treatment. *J Pediatr (Rio J)* 2007; 83(5 Suppl): 209-216.
10. Hashimoto H. (1912). "Zur Kenntnis der lymphomatösen Veränderung der Schilddrüse (Struma lymphomatosa)". *Archiv für klinische Chirurgie (Berlin)* 97: 219–248.
11. Jarzab B., Lewinski A., Płaczkiewicz-Jankowska E.: *Choroby Tarczycy. W: Choroby Wewnętrzne Tom I i II, Szczeklik A. (red.), Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, Kraków 2005, s.1033-1095*
12. Weetman AP: Immunity, thyroid function and pregnancy: molecular mechanisms. *Nat Rev Endocrinol* 2010; 6(6): 311-318.
13. Klecha AJ, Barreiro Arcos ML, Frick L, Genaro AM, Cremaschi G: Immune-endocrine interactions in autoimmune thyroid diseases. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15(1): 68-75.
14. Davies T, Marians R, Latif R: The TSH receptor reveals itself. *J Clin Invest* 2002; 110(2): 161-164.
15. Michalek K, Morshed SA, Latif R, Davies TF: TSH receptor autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2009; 9(2): 113-116.
16. Latif R, Morshed SA, Zaidi M, Davies TF: The thyroid-stimulating hormone receptor: impact of thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor antibodies on multimerization, cleavage, and signaling. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2009; 38(2): 319-341.

17. Birrell G, Cheetham T: Juvenile thyrotoxicosis; can we do better? *Arch Dis Child* 2004; 89(8): 745-750.
18. Papendieck P, Chiesa A, Prieto L, Gruneiro-Papendieck L: Thyroid disorders of neonates born to mothers with Graves' disease. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2009; 22(6): 547-553.
19. Robert Graves: 1796-1852. *Br J Hosp Med (Lond)* 2006; 67(6): 313.
20. Graves RJ. New observed affection of the thyroid gland in females. (Clinical lectures.) *London Medical and Surgical Journal (Renshaw)* 1835; 7: 516-517. Reprinted in *Medical Classics*, 1940;5: 33-36.
21. Von Basedow K.A. Exophthalmus durch Hypertrophie des Zellgewebes in der Augenhöhle. [Casper's] *Wochenschrift für die gesammte Heilkunde*, Berlin 1840, 6: 197-204; 220-228.
22. Huber A, Menconi F, Corathers S, Jacobson EM, Tomer Y: Joint genetic susceptibility to type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis: from epidemiology to mechanisms. *Endocr Rev* 2008; 29(6): 697-725.
23. Surks MI, Hollowell JG: Age-specific distribution of serum thyrotropin and antithyroid antibodies in the US population: implications for the prevalence of subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(12): 4575-4582.
24. Brown RS: Autoimmune thyroid disease: unlocking a complex puzzle. *Curr Opin Pediatr* 2009; 21(4): 523-528.
25. Weetman AP: Cellular immune responses in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 61(4): 405-413.
26. Kawashima A, Tanigawa K, Akama T, Yoshihara A, Ishii N, Suzuki K: Innate immune activation and thyroid autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(12): 3661-3671.
27. Brown R, Francis GL: Autoimmune thyroid disorders. *J Thyroid Res* 2011; 2011: doi 10.4061/2011/432890.
28. Wang SH, Baker JR: The role of apoptosis in thyroid autoimmunity. *Thyroid* 2007; 17(10): 975-979.
29. Weetman AP: The Immunopathogenesis of Chronic Autoimmune Thyroiditis One Century after Hashimoto. *Eur Thyroid J* 2012; 1: 243–250.
30. Tomer Y: Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present, and future. *Thyroid* 2010; 20(7): 715-725.
31. Eschler DC, Hasham A, Tomer Y: Cutting edge: the etiology of autoimmune thyroid diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011; 41(2): 190-197.
32. Tomer Y, Davies TF: Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: from gene mapping to gene function. *Endocr Rev* 2003; 24(5): 694-717.
33. Brix TH, Kyvik KO, Christensen K, Hegedus L: Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: a population-based study of two Danish twin cohorts. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(2): 930-934.

34. Brix TH, Kyvik KO, Hegedus L: A population-based study of chronic autoimmune hypothyroidism in Danish twins. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(2): 536-539.
35. Ringold DA, Nicoloff JT, Kesler M, Davis H, Hamilton A, Mack T: Further evidence for a strong genetic influence on the development of autoimmune thyroid disease: the California twin study. *Thyroid* 2002; 12(8): 647-653.
36. Jacobson EM, Huber A, Tomer Y: The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: from epidemiology to etiology. *J Autoimmun* 2008; 30(1-2): 58-62.
37. Ban Y: Genetic factors of autoimmune thyroid diseases in Japanese. *Autoimmune Dis* 2012; 2012: doi 10.1155/2012/236981.
38. Jacobson EM, Tomer Y: The CD40, CTLA-4, thyroglobulin, TSH receptor, and PTPN22 gene quintet and its contribution to thyroid autoimmunity: back to the future. *J Autoimmun* 2007; 28(2-3): 85-98.
39. Tomer Y, Huber A: The etiology of autoimmune thyroid disease: a story of genes and environment. *J Autoimmun* 2009; 32(3-4): 231-239.
40. Ban Y, Tomer Y: Susceptibility genes in thyroid autoimmunity. *Clin Dev Immunol* 2005; 12(1): 47-58.
41. Wiebolt J, Koeleman BP, van Haefen TW: Endocrine autoimmune disease: genetics become complex. *Eur J Clin Invest* 2010; 40(12): 1144-1155.
42. Zeitlin AA, Heward JM, Newby PR, Carr-Smith JD, Franklyn JA, Gough SC, Simmonds MJ: Analysis of HLA class II genes in Hashimoto's thyroiditis reveals differences compared to Graves' disease. *Genes Immun* 2008; 9(4): 358-363.
43. Davies TF, Latif R, Yin X: New genetic insights from autoimmune thyroid disease. *J Thyroid Res* 2012; 2012: doi 10.1155/2012/623852.
44. Chistiakov DA, Turakulov RI: CTLA-4 and its role in autoimmune thyroid disease. *J Mol Endocrinol* 2003; 31(1): 21-36.
45. Tomer Y, Greenberg DA, Barbesino G, Concepcion E, Davies TF: CTLA-4 and not CD28 is a susceptibility gene for thyroid autoantibody production. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(4): 1687-1693.
46. Kavvoura FK, Akamizu T, Awata T, Ban Y, Chistiakov DA, Frydecka I, Ghaderi A, Gough SC, Hiromatsu Y, Ploski R, Wang PW, Bednarczuk T, Chistiakova EI, Chojm M, Heward JM, Hiratani H, Juo SH, Karabon L, Katayama S, Kurihara S, Liu RT, Miyake I, Omrani GH, Pawlak E, Taniyama M, Tozaki T, Ioannidis JP: Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 gene polymorphisms and autoimmune thyroid disease: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(8): 3162-3170.
47. Pastuszek-Lewandoska D, Sewerynek E, Domanska D, Gladys A, Skrzypczak R, Brzezianska E: CTLA-4 gene polymorphisms and their influence on predisposition to autoimmune thyroid diseases (Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis). *Arch Med Sci* 2012; 8(3): 415-421.
48. Jacobson EM, Tomer Y: The genetic basis of thyroid autoimmunity. *Thyroid* 2007; 17(10): 949-961.

49. Zhang J, Zahir N, Jiang Q, Miliotis H, Heyraud S, Meng X, Dong B, Xie G, Qiu F, Hao Z, McCulloch CA, Keystone EC, Peterson AC, Siminovitch KA: The autoimmune disease-associated PTPN22 variant promotes calpain-mediated Lyp/Pep degradation associated with lymphocyte and dendritic cell hyperresponsiveness. *Nat Genet* 2011; 43(9): 902-907.
50. Burn GL, Svensson L, Sanchez-Blanco C, Saini M, Cope AP: Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? *FEBS Lett* 2011; 585(23): 3689-3698.
51. Ganesh BB, Bhattacharya P, Gopisetty A, Prabhakar BS: Role of cytokines in the pathogenesis and suppression of thyroid autoimmunity. *J Interferon Cytokine Res* 2011; 31(10): 721-731.
52. Nunez Miguel R, Sanders J, Jeffreys J, Depraetere H, Evans M, Richards T, Blundell TL, Rees Smith B, Furmaniak J: Analysis of the thyrotropin receptor-thyrotropin interaction by comparative modeling. *Thyroid* 2004; 14(12): 991-1011.
53. Swain M, Swain T, Mohanty BK: Autoimmune thyroid disorders-An update. *Indian J Clin Biochem* 2005; 20(1): 9-17.
54. Tomer Y, Greenberg DA, Concepcion E, Ban Y, Davies TF: Thyroglobulin is a thyroid specific gene for the familial autoimmune thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(1): 404-407.
55. Stefan M, Jacobson EM, Huber AK, Greenberg DA, Li CW, Skrabanek L, Conception E, Fadlalla M, Ho K, Tomer Y: Novel variant of thyroglobulin promoter triggers thyroid autoimmunity through an epigenetic interferon alpha-modulated mechanism. *J Biol Chem* 2011; 286(36): 31168-31179.
56. Kong YC, Morris GP, Brown NK, Yan Y, Flynn JC, David CS: Autoimmune thyroiditis: a model uniquely suited to probe regulatory T cell function. *J Autoimmun* 2009; 33(3-4): 239-246.
57. Stacha W.: Przewlekłe autoimmunologiczne zapalenie tarczycy u dzieci-ocena retrospektywna choroby w latach 2000-2005 na podstawie materiału Kliniki Endokrynologii i Diabetologii Wieku Rozwojowego AM w Poznaniu. Rozprawa doktorska; Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2007.
58. Brent GA: Environmental exposures and autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 2010; 20(7): 755-761.
59. Vestergaard P, Rejnmark L, Weeke J, Hoeck HC, Nielsen HK, Rungby J, Laurberg P, Mosekilde L: Smoking as a risk factor for Graves' disease, toxic nodular goiter, and autoimmune hypothyroidism. *Thyroid* 2002; 12(1): 69-75.
60. Elenkov IJ, Chrousos GP: Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 290-303.
61. Rose NR, Bonita R, Burek CL: Iodine: an environmental trigger of thyroiditis. *Autoimmun Rev* 2002; 1(1-2): 97-103.
62. Zois C, Stavrou I, Svarna E, Seferiadis K, Tsatsoulis A: Natural course of autoimmune thyroiditis after elimination of iodine deficiency in northwestern Greece. *Thyroid* 2006; 16(3): 289-293.

63. Papanastasiou L, Vatalas IA, Koutras DA, Mastorakos G: Thyroid autoimmunity in the current iodine environment. *Thyroid* 2007; 17(8): 729-739.
64. Laurberg P, Bulow Pedersen I, Knudsen N, Ovesen L, Andersen S: Environmental iodine intake affects the type of nonmalignant thyroid disease. *Thyroid* 2001; 11(5): 457-469.
65. Koziellewicz D, Halota W: Interferon-induced thyroiditis during treatment of chronic hepatitis C. *Endokrynologia Polska* 2012; 63(1): 66-70.
66. Tomer Y, Blackard JT, Akeno N: Interferon alpha treatment and thyroid dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2007; 36(4): 1051-1066.
67. Mazziotti G, Sorvillo F, Piscopo M, Morisco F, Cioffi M, Stornaiuolo G, Gaeta GB, Molinari AM, Lazarus JH, Amato G, Carella C: Innate and acquired immune system in patients developing interferon-alpha-related autoimmune thyroiditis: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(7): 4138-4144.
68. Akeno N, Smith EP, Stefan M, Huber AK, Zhang W, Keddache M, Tomer Y: IFN-alpha mediates the development of autoimmunity both by direct tissue toxicity and through immune cell recruitment mechanisms. *J Immunol* 2011; 186(8): 4693-4706.
69. Bogazzi F, Bartalena L, Gasperi M, Braverman LE, Martino E: The various effects of amiodarone on thyroid function. *Thyroid* 2001; 11(5): 511-519.
70. Zosin I, Balas M: Amiodarone-induced thyroid dysfunction in an iodine-replete area: epidemiological and clinical data. *Endokrynologia Polska* 2012; 63(1): 2-9.
71. Kirov G, Tredget J, John R, Owen MJ, Lazarus JH: A cross-sectional and a prospective study of thyroid disorders in lithium-treated patients. *J Affect Disord* 2005; 87(2-3): 313-317.
72. Corapcioglu D, Tonyukuk V, Kiyan M, Yilmaz AE, Emral R, Kamel N, Erdogan G: Relationship between thyroid autoimmunity and *Yersinia enterocolitica* antibodies. *Thyroid* 2002; 12(7): 613-617.
73. Zaletel K, Gaberscek S: Hashimoto's Thyroiditis: From Genes to the Disease. *Curr Genomics* 2011; 12(8): 576-588.
74. Weetman AP: Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. *Eur J Endocrinol* 2003; 148(1): 1-9.
75. Collins J, Gough S: Autoimmunity in thyroid disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002; 29 Suppl 2: 417-424.
76. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M: Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133(5): 775-787.
77. Shevach EM: Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 423-449.
78. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM: Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006; 24(6): 677-688.
79. Berger A: Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ* 2000; 321(7258): 424.

80. Fountoulakis S, Tsatsoulis A: On the pathogenesis of autoimmune thyroid disease: a unifying hypothesis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60(4): 397-409.
81. Salmaso C, Bagnasco M, Pesce G, Montagna P, Brizzolara R, Altrinetti V, Richiusa P, Galluzzo A, Giordano C: Regulation of apoptosis in endocrine autoimmunity: insights from Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 496-501.
82. Bretz JD, Baker JR, Jr.: Apoptosis and autoimmune thyroid disease: following a TRAIL to thyroid destruction? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001; 55(1): 1-11.
83. Giordano C, Richiusa P, Bagnasco M, Pizzolanti G, Di Blasi F, Sbriglia MS, Mattina A, Pesce G, Montagna P, Capone F, Misiano G, Scorsone A, Pugliese A, Galluzzo A: Differential regulation of Fas-mediated apoptosis in both thyrocyte and lymphocyte cellular compartments correlates with opposite phenotypic manifestations of autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 2001; 11(3): 233-244.
84. Nagayama Y: Graves' animal models of Graves' hyperthyroidism. *Thyroid* 2007; 17(10): 981-988.
85. Traves SL, Donnelly LE: Th17 cells in airway diseases. *Curr Mol Med* 2008; 8(5): 416-426.
86. Nanba T, Watanabe M, Inoue N, Iwatani Y: Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease. *Thyroid* 2009; 19(5): 495-501.
87. Figueroa-Vega N, Alfonso-Perez M, Benedicto I, Sanchez-Madrid F, Gonzalez-Amaro R, Marazuela M: Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(2): 953-962.
88. Idźkowska E, Bossowski A, Noiszewska K, Sawicka B, Bossowska A: Analiza stężenia IL-17 i IL-23 w dynamice chorób autoimmunizacyjnych tarczycy u młodocianych. *Endokrynologia Pediatria* 2012; 3(40): 17-26.
89. Sakaguchi S: Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6(4): 345-352.
90. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299(5609): 1057-1061.
91. Nakano A, Watanabe M, Iida T, Kuroda S, Matsuzuka F, Miyauchi A, Iwatani Y: Apoptosis-induced decrease of intrathyroidal CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in autoimmune thyroid diseases. *Thyroid* 2007; 17(1): 25-31.
92. Fu S, Yopp AC, Mao X, Chen D, Zhang N, Mao M, Ding Y, Bromberg JS: CD4+ CD25+ CD62+ T-regulatory cell subset has optimal suppressive and proliferative potential. *Am J Transplant* 2004; 4(1): 65-78.
93. Mao C, Wang S, Xiao Y, Xu J, Jiang Q, Jin M, Jiang X, Guo H, Ning G, Zhang Y: Impairment of regulatory capacity of CD4+CD25+ regulatory T cells mediated by dendritic cell polarization and hyperthyroidism in Graves' disease. *J Immunol* 2011; 186(8): 4734-4743.
94. Tsatsoulis A: The role of stress in the clinical expression of thyroid autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1088: 382-395.

95. Phenekos C, Vryonidou A, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Goula M, Papamichail M: Th1 and Th2 serum cytokine profiles characterize patients with Hashimoto's thyroiditis (Th1) and Graves' disease (Th2). *Neuroimmunomodulation* 2004; 11(4): 209-213.
96. Caturegli P: Autoimmune hypophysitis: an underestimated disease in search of its autoantigen(s). *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(6): 2038-2040.
97. Belyavin G, Trotter WR: Investigations of thyroid antigens reacting with Hashimoto sera; evidence for an antigen other than thyroglobulin. *Lancet* 1959; 1(7074): 648-652.
98. Prummel MF, Wiersinga WM: Thyroid peroxidase autoantibodies in euthyroid subjects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19(1): 1-15.
99. Fink H, Hintze G: [Autoimmune thyroiditis (Hashimoto's thyroiditis): current diagnostics and therapy]. *Med Klin (Munich)* 2010; 105(7): 485-493.
100. Jastrzebska-Bohaterewicz E, Gardas A: Proportion of antibodies to the A and B immunodominant regions of thyroid peroxidase in Graves and Hashimoto disease. *Autoimmunity* 2004; 37(3): 211-216.
101. Hadj-Kacem H, Rebuffat S, Mnif-Feki M, Belguith-Maalej S, Ayadi H, Peraldi-Roux S: Autoimmune thyroid diseases: genetic susceptibility of thyroid-specific genes and thyroid autoantigens contributions. *Int J Immunogenet* 2009; 36(2): 85-96.
102. Kramer CK, Tourinho TF, de Castro WP, da Costa Oliveira M: Association between systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, hyperprolactinemia and thyroid autoantibodies. *Arch Med Res* 2005; 36(1): 54-58.
103. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, Braverman LE: Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(2): 489-499.
104. Bar-Andziak E, Milewicz A, Jedrzejuk D, Arkowska A, Mieszczanowicz U, Krzyzanowska-Swiniarska B: Thyroid dysfunction and thyroid autoimmunity in a large unselected population of elderly subjects in Poland - the 'PolSenior' multicentre crossover study. *Endokrynol Pol* 2012; 63(5): 346-355.
105. Quadbeck B, Hoermann R, Hahn S, Roggenbuck U, Mann K, Janssen OE: Binding, stimulating and blocking TSH receptor antibodies to the thyrotropin receptor as predictors of relapse of Graves' disease after withdrawal of antithyroid treatment. *Horm Metab Res* 2005; 37(12): 745-750.
106. Eckstein AK, Plicht M, Lax H, Neuhauser M, Mann K, Lederbogen S, Heckmann C, Esser J, Morgenthaler NG: Thyrotropin receptor autoantibodies are independent risk factors for Graves' ophthalmopathy and help to predict severity and outcome of the disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(9): 3464-3470.
107. Eckstein A, Mann K, Kahaly GJ, Grussendorf M, Reiners C, Feldkamp J, Quadbeck B, Bockisch A, Schott M: [Role of TSH receptor autoantibodies for the diagnosis of Graves' disease and for the prediction of the course of hyperthyroidism and ophthalmopathy. Recommendations of the Thyroid Section of the German Society of Endocrinology]. *Med Klin (Munich)* 2009; 104(5): 343-348.

108. Smith BR, Sanders J, Furmaniak J: TSH receptor antibodies. *Thyroid* 2007; 17(10): 923-938.
109. Kamath C, Adlan MA, Premawardhana LD: The role of thyrotrophin receptor antibody assays in Graves' disease. *J Thyroid Res* 2012; 2012: doi 10.1155/2012/525936.
110. Tozzoli R, Bagnasco M, Giavarina D, Bizzaro N: TSH receptor autoantibody immunoassay in patients with Graves' disease: improvement of diagnostic accuracy over different generations of methods. Systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 2012; 12(2): 107-113.
111. Zophel K, Roggenbuck D, Schott M: Clinical review about TRAb assay's history. *Autoimmun Rev* 2010; 9(10): 695-700.
112. Myśliwiec J, Krętowski A: Apoptoza w patogenezie autoimmunologicznych chorób tarczycy: rola cytokin. *Endokrynol Pol* 2001; 52: 275-281.
113. Stachura J: Uszkodzenie i śmierć komórki. W: *Patologia znacząca nauka o chorobie* Tom I, Stachura J, Domagała W (red.), Polska Akademia Umiejętności, Kraków 2005, s. 5-33.
114. Nagata S, Hanayama R, Kawane K: Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 2010; 140(5): 619-630.
115. Andrikoula M, Tsatsoulis A: The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid disease. *Eur J Endocrinol* 2001; 144(6): 561-568.
116. Wang SH, Van Antwerp M, Kuick R, Gauger PG, Doherty GM, Fan YY, Baker JR, Jr.: Microarray analysis of cytokine activation of apoptosis pathways in the thyroid. *Endocrinology* 2007; 148(10): 4844-4852.
117. Ahmad M, Shi Y: TRAIL-induced apoptosis of thyroid cancer cells: potential for therapeutic intervention. *Oncogene* 2000; 19(30): 3363-3371.
118. Mitsiades N, Poulaki V, Mitsiades CS, Koutras DA, Chrousos GP: Apoptosis induced by FasL and TRAIL/Apo2L in the pathogenesis of thyroid diseases. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12(9): 384-390.
119. Chen S, Fazle Akbar SM, Zhen Z, Luo Y, Deng L, Huang H, Chen L, Li W: Analysis of the expression of Fas, FasL and Bcl-2 in the pathogenesis of autoimmune thyroid disorders. *Cell Mol Immunol* 2004; 1(3): 224-228.
120. Arscott PL, Baker JR, Jr.: Apoptosis and thyroiditis. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 87(3): 207-217.
121. Fountoulakis S, Vartholomatos G, Kolaitis N, Frilingos S, Philippou G, Tsatsoulis A: Differential expression of Fas system apoptotic molecules in peripheral lymphocytes from patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *Eur J Endocrinol* 2008; 158(6): 853-859.
122. Bossowski A, Czarnocka B, Bardadin K, Stasiak-Barmuta A, Urban M, Dadan J, Ratomski K, Bossowska A: Identification of apoptotic proteins in thyroid gland from patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *Autoimmunity* 2008; 41(2): 163-173.

123. Stassi G, De Maria R: Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(3): 195-204.
124. Mezosi E, Wang SH, Utsugi S, Bajnok L, Bretz JD, Gauger PG, Thompson NW, Baker JR, Jr.: Induction and regulation of Fas-mediated apoptosis in human thyroid epithelial cells. *Mol Endocrinol* 2005; 19(3): 804-811.
125. Nabipour I, Kalantarhormozi M, Assadi M, Jafari SM, Gharibi M, Ahmadi E, Sanjdideh Z: Influence of levothyroxine treatment on serum levels of soluble Fas (CD95) and Fas Ligand (CD95L) in chronic autoimmune hypothyroidism. *Endocrine* 2010; 38(3): 406-411.
126. Bossowski A, Stasiak-Barmuta A, Czarnocka B, Urban M, Lyczkowska A, Niedziela M, Bardadin K, Czerwinska J, Dadan J, Baltaziak M: [Cytofluorometric analysis of chosen markers of apoptosis CD95/CD95L (Fas/FasL) in thyroid tissues from young patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis]. *Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw* 2006; 12(2): 83-90.
127. Bossowski A, Moniuszko A, Bouzyk J, Urban M: [Role of apoptosis in autoimmune thyroid disorders]. *Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw* 2006; 12(3): 216-220.
128. Sreelekha TT, Pradeep VM, Vijayalakshmi K, Belthazar A, Chellam VG, Nair MB, Pillai MR: In situ apoptosis in the thyroid. *Thyroid* 2000; 10(2): 117-122.
129. Bretz JD, Rymaszewski M, Arscott PL, Myc A, Ain KB, Thompson NW, Baker JR, Jr.: TRAIL death pathway expression and induction in thyroid follicular cells. *J Biol Chem* 1999; 274(33): 23627-23632.
130. Bretz JD, Mezosi E, Giordano TJ, Gauger PG, Thompson NW, Baker JR, Jr.: Inflammatory cytokine regulation of TRAIL-mediated apoptosis in thyroid epithelial cells. *Cell Death Differ* 2002; 9(3): 274-286.
131. Ajjan RA, Weetman AP: Cytokines in thyroid autoimmunity. *Autoimmunity* 2003; 36(6-7): 351-359.
132. Prud'homme GJ, Piccirillo CA: The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 (TGF-beta1) in autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2000; 14(1): 23-42.
133. Pedro AB, Romaldini JH, Takei K: Changes of serum cytokines in hyperthyroid Graves' disease patients at diagnosis and during methimazole treatment. *Neuroimmunomodulation* 2011; 18(1): 45-51.
134. Rasmussen AK: Cytokine actions on the thyroid gland. *Dan Med Bull* 2000; 47(2): 94-114.
135. Hunt PJ, Marshall SE, Weetman AP, Bell JI, Wass JA, Welsh KI: Cytokine gene polymorphisms in autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(5): 1984-1988.
136. Gianoukakis AG, Khadavi N, Smith TJ: Cytokines, Graves' disease, and thyroid-associated ophthalmopathy. *Thyroid* 2008; 18(9): 953-958.
137. Ajjan RA, Watson PF, McIntosh RS, Weetman AP: Intrathyroidal cytokine gene expression in Hashimoto's thyroiditis. *Clin Exp Immunol* 1996; 105(3): 523-528.

138. O'Shea JJ, Visconti R: Type 1 IFNs and regulation of TH1 responses: enigmas both resolved and emerge. *Nat Immunol* 2000; 1(1): 17-19.
139. Nakagawa T, Tsuruoka M, Ogura H, Okuyama Y, Arima Y, Hirano T, Murakami M: IL-6 positively regulates Foxp3+CD8+ T cells in vivo. *Int Immunol* 2010; 22(2): 129-139.
140. Palazzo FF, Hammond LJ, Goode AW, Mirakian R: Death of the autoimmune thyrocyte: is it pushed or does it jump? *Thyroid* 2000; 10(7): 561-572.
141. Krupinska J, Wawrzynowicz-Syczewska M, Urbanowicz W, Poblocki J, Syrenicz A: The influence of interferon alpha on the induction of autoimmune thyroiditis in patients treated for chronic viral hepatitis type C. *Endokrynol Pol* 2011; 62(6): 517-522.
142. Kishimoto T: Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther* 2006; 8 Suppl 2: doi 10.1186/ar1916.
143. Jones SA, Richards PJ, Scheller J, Rose-John S: IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J Interferon Cytokine Res* 2005; 25(5): 241-253.
144. Gołab J, Jakóbsiak M, Lasek W. et al. *Cytokiny. Immunologia. Warszawa, Wyd Nauk PWN, 2002; 15: 198-205.*
145. Klimiuk PA, Sierakowski S: [Cytokines in rheumatoid arthritis. I. Proinflammatory cytokines]. *Pol Merkur Lekarski* 2001; 11(66): 510-513.
146. Nishimoto N, Kishimoto T: Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2(11): 619-626.
147. Kallen KJ: The role of transsignalling via the agonistic soluble IL-6 receptor in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1592(3): 323-343.
148. Gabay C: Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther* 2006; 8 Suppl 2: doi 10.1186/ar1917.
149. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T: The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res* 2002; 4 Suppl 3: 233-242.
150. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA: Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 2006; 80(2): 227-236.
151. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK: Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008; 453(7198): 1051-1057.
152. Bellone S, Watts K, Cane S, Palmieri M, Cannon MJ, Burnett A, Roman JJ, Pecorelli S, Santin AD: High serum levels of interleukin-6 in endometrial carcinoma are associated with uterine serous papillary histology, a highly aggressive and chemotherapy-resistant variant of endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2005; 98(1): 92-98.
153. Songur N, Kuru B, Kalkan F, Ozdilekcan C, Cakmak H, Hizek N: Serum interleukin-6 levels correlate with malnutrition and survival in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Tumori* 2004; 90(2): 196-200.

154. Belluco C, Nitti D, Frantz M, Toppan P, Basso D, Plebani M, Lise M, Jessup JM: Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2000; 7(2): 133-138.
155. Negrier S, Perol D, Menetrier-Caux C, Escudier B, Pallardy M, Ravaud A, Douillard JY, Chevreau C, Lasset C, Blay JY: Interleukin-6, interleukin-10, and vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: prognostic value of interleukin-6--from the Groupe Francais d'Immunotherapie. *J Clin Oncol* 2004; 22(12): 2371-2378.
156. Zakrzewska I, Poznanski J: [Changes of serum il-6 and CRP after chemotherapy in patients with ovarian carcinoma]. *Pol Merkur Lekarski* 2001; 11(63): 210-213.
157. Garcia-Tunon I, Ricote M, Ruiz A, Fraile B, Paniagua R, Royuela M: IL-6, its receptors and its relationship with bcl-2 and bax proteins in infiltrating and in situ human breast carcinoma. *Histopathology* 2005; 47(1): 82-89.
158. Culig Z, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A: Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *J Cell Biochem* 2005; 95(3): 497-505.
159. Weetman AP, Bright-Thomas R, Freeman M: Regulation of interleukin-6 release by human thyrocytes. *J Endocrinol* 1990; 127(2): 357-361.
160. Dinarello CA: The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20(5 Suppl 27): 1-13.
161. Rasmussen AK, Bendtzen K, Feldt-Rasmussen U: Thyrocyte-interleukin-1 interactions. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108(2): 67-71.
162. Ashwood P, Harvey R, Verjee T, Wolstencroft R, Thompson RP, Powell JJ: Functional interactions between mucosal IL-1, IL-ra and TGF-beta 1 in ulcerative colitis. *Inflamm Res* 2004; 53(2): 53-59.
163. Liu ZG: Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res* 2005; 15(1): 24-27.
164. Paridaens D, van den Bosch WA, van der Loos TL, Krenning EP, van Hagen PM: The effect of etanercept on Graves' ophthalmopathy: a pilot study. *Eye (Lond)* 2005; 19(12): 1286-1289.
165. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH: Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 1999; 5(2): 157-163.
166. Almasan A, Ashkenazi A: Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14(3-4): 337-348.
167. Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR: Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998; 273(23): 14363-14367.
168. Truneh A, Sharma S, Silverman C, Khandekar S, Reddy MP, Deen KC, McLaughlin MM, Srinivasula SM, Livi GP, Marshall LA, Alnemri ES, Williams WV, Doyle ML:

- Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. *J Biol Chem* 2000; 275(30): 23319-23325.
169. Wang SH, Cao Z, Wolf JM, Van Antwerp M, Baker JR, Jr.: Death ligand tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand inhibits experimental autoimmune thyroiditis. *Endocrinology* 2005; 146(11): 4721-4726.
 170. Stassi G, Zeuner A, Di Liberto D, Todaro M, Ricci-Vitiani L, De Maria R: Fas-FasL in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Immunol* 2001; 21(1): 19-23.
 171. Baker JR, Jr.: The nature of apoptosis in the thyroid and the role it may play in autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 2001; 11(3): 245-247.
 172. Hofbauer LC, Schoppet M: Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 2004; 292(4): 490-495.
 173. Hofbauer LC, Heufelder AE: Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med (Berl)* 2001; 79(5-6): 243-253.
 174. Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K: CLINICAL Review #: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(12): 4514-4521.
 175. Hofbauer LC, Kluger S, Kuhne CA, Dunstan CR, Burchert A, Schoppet M, Zielke A, Heufelder AE: Detection and characterization of RANK ligand and osteoprotegerin in the thyroid gland. *J Cell Biochem* 2002; 86(4): 642-650.
 176. Heymann MF, Riet A, Le Goff B, Battaglia S, Paineau J, Heymann D: OPG, RANK and RANK ligand expression in thyroid lesions. *Regul Pept* 2008; 148(1-3): 46-53.
 177. Amato G, Mazziotti G, Sorvillo F, Piscopo M, Lalli E, Biondi B, Iorio S, Molinari A, Giustina A, Carella C: High serum osteoprotegerin levels in patients with hyperthyroidism: effect of medical treatment. *Bone* 2004; 35(3): 785-791.
 178. Abe E, Marians RC, Yu W, Wu XB, Ando T, Li Y, Iqbal J, Eldeiry L, Rajendren G, Blair HC, Davies TF, Zaidi M: TSH is a negative regulator of skeletal remodeling. *Cell* 2003; 115(2): 151-162.
 179. Nagasaki T, Inaba M, Jono S, Hiura Y, Tahara H, Shirakawa K, Onoda N, Ishikawa T, Ishimura E, Nishizawa Y: Increased levels of serum osteoprotegerin in hypothyroid patients and its normalization with restoration of normal thyroid function. *Eur J Endocrinol* 2005; 152(3): 347-353.
 180. Vestergaard P, Rejnmark L, Weeke J, Mosekilde L: Fracture risk in patients treated for hyperthyroidism. *Thyroid* 2000; 10(4): 341-348.
 181. Murphy E, Williams GR: The thyroid and the skeleton. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 61(3): 285-298.
 182. Raggi P, Giachelli C, Bellasi A: Interaction of vascular and bone disease in patients with normal renal function and patients undergoing dialysis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007; 4(1): 26-33.
 183. Palczewska I, Niedzwiedzka Z: [Somatic development indices in children and youth of Warsaw]. *Med Wieku Rozwoj* 2001; 5(2 Suppl 1): 18-118.

184. Aust G, Scherbaum WA: Expression of cytokines in the thyroid: thyrocytes as potential cytokine producers. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996; 104 Suppl 4: 64-67.
185. Gianoukakis AG, Douglas RS, King CS, Cruikshank WW, Smith TJ: Immunoglobulin G from patients with Graves' disease induces interleukin-16 and RANTES expression in cultured human thyrocytes: a putative mechanism for T-cell infiltration of the thyroid in autoimmune disease. *Endocrinology* 2006; 147(4): 1941-1949.
186. Ajjan RA, Watson PF, Weetman AP: Cytokines and thyroid function. *Adv Neuroimmunol* 1996; 6(4): 359-386.
187. Sato K, Satoh T, Shizume K, Ozawa M, Han DC, Imamura H, Tsushima T, Demura H, Kanaji Y, Ito Y, et al.: Inhibition of 125I organification and thyroid hormone release by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-gamma in human thyrocytes in suspension culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70(6): 1735-1743.
188. Gerard AC, Boucquey M, van den Hove MF, Colin IM: Expression of TPO and ThOXs in human thyrocytes is downregulated by IL-1alpha/IFN-gamma, an effect partially mediated by nitric oxide. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291(2): E242-253.
189. Gianoukakis AG, Jennings TA, King CS, Sheehan CE, Hoa N, Heldin P, Smith TJ: Hyaluronan accumulation in thyroid tissue: evidence for contributions from epithelial cells and fibroblasts. *Endocrinology* 2007; 148(1): 54-62.
190. Ewert P, Aguilera S, Alliende C, Kwon YJ, Albornoz A, Molina C, Urzua U, Quest AF, Olea N, Perez P, Castro I, Barrera MJ, Romo R, Hermoso M, Leyton C, Gonzalez MJ: Disruption of tight junction structure in salivary glands from Sjogren's syndrome patients is linked to proinflammatory cytokine exposure. *Arthritis Rheum* 2010; 62(5): 1280-1289.
191. Gretzer C, Thomsen P, Jansson S, Nilsson M: Co-culture of human monocytes and thyrocytes in bicameral chamber: monocyte-derived IL-1alpha impairs the thyroid epithelial barrier. *Cytokine* 2000; 12(1): 32-40.
192. Nilsson M, Husmark J, Bjorkman U, Ericson LE: Cytokines and thyroid epithelial integrity: interleukin-1alpha induces dissociation of the junctional complex and paracellular leakage in filter-cultured human thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(3): 945-952.
193. Rebuffat SA, Kammoun-Krichen M, Charfeddine I, Ayadi H, Bougacha-Elleuch N, Peraldi-Roux S: IL-1beta and TSH disturb thyroid epithelium integrity in autoimmune thyroid diseases. *Immunobiology* 2013; 218(3): 285-291.
194. Diez JJ, Hernanz A, Medina S, Bayon C, Iglesias P: Serum concentrations of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and soluble TNF-alpha receptor p55 in patients with hypothyroidism and hyperthyroidism before and after normalization of thyroid function. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; 57(4): 515-521.
195. Salvi M, Pedrazzoni M, Girasole G, Giuliani N, Minelli R, Wall JR, Roti E: Serum concentrations of proinflammatory cytokines in Graves' disease: effect of treatment, thyroid function, ophthalmopathy and cigarette smoking. *Eur J Endocrinol* 2000; 143(2): 197-202.

196. Lakatos P, Foldes J, Horvath C, Kiss L, Tatrai A, Takacs I, Tarjan G, Stern PH: Serum interleukin-6 and bone metabolism in patients with thyroid function disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(1): 78-81.
197. Celik I, Akalin S, Erbas T: Serum levels of interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha in hyperthyroid patients before and after propylthiouracil treatment. *Eur J Endocrinol* 1995; 132(6): 668-672.
198. Siddiqi A, Monson JP, Wood DF, Besser GM, Burrin JM: Serum cytokines in thyrotoxicosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(2): 435-439.
199. Wakelkamp IM, Gerding MN, Van Der Meer JW, Prummel MF, Wiersinga WM: Both Th1- and Th2-derived cytokines in serum are elevated in Graves' ophthalmopathy. *Clin Exp Immunol* 2000; 121(3): 453-457.
200. Pichler R, Maschek W, Hatzl-Griesenhofer M, Huber H, Crespillo-Gomez C, Berg J: Soluble tumour necrosis factor-alpha receptor I and interleukin-6 as markers of activity in thyrotoxic Graves' disease. *Horm Metab Res* 2003; 35(7): 427-433.
201. Kiziltunc A, Basoglu M, Avci B, Capoglu I: Serum IL-6 and TNF-a in Patients With Thyroid Disorders. *Turk J Med Sci* 1999; 29(1): 25-30.
202. Akalin A, Colak O, Alatas O, Efe B: Bone remodelling markers and serum cytokines in patients with hyperthyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; 57(1): 125-129.
203. Kamimura D, Ishihara K, Hirano T: IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003; 149: 1-38.
204. Hirano T: Interleukin 6 in autoimmune and inflammatory diseases: a personal memoir. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2010; 86(7): 717-730.
205. Jiskra J, Antosova M, Limanova Z, Telicka Z, Lacinova Z: The relationship between thyroid function, serum monokine induced by interferon gamma and soluble interleukin-2 receptor in thyroid autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* 2009; 156(2): 211-216.
206. Karanikas G, Schuetz M, Wahl K, Paul M, Kontur S, Pietschmann P, Kletter K, Dudczak R, Willheim M: Relation of anti-TPO autoantibody titre and T-lymphocyte cytokine production patterns in Hashimoto's thyroiditis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 63(2): 191-196.
207. Nielsen CH, Brix TH, Leslie RG, Hegedus L: A role for autoantibodies in enhancement of pro-inflammatory cytokine responses to a self-antigen, thyroid peroxidase. *Clin Immunol* 2009; 133(2): 218-227.
208. Mori K, Yoshida K, Mihara M, Ohsugi Y, Nakagawa Y, Hoshikawa S, Ozaki H, Ito S: Effects of interleukin-6 blockade on the development of autoimmune thyroiditis in nonobese diabetic mice. *Autoimmunity* 2009; 42(3): 228-234.
209. Ruggeri RM, Sciacchitano S, Vitale A, Cardelli P, Galletti M, Vitarelli E, Barresi G, Benvenga S, Trimarchi F, Trovato M: Serum hepatocyte growth factor is increased in Hashimoto's thyroiditis whether or not it is associated with nodular goiter as compared with healthy non-goitrous individuals. *J Endocrinol Invest* 2009; 32(5): 465-469.

210. Sieminska L, Wojciechowska C, Kos-Kudla B, Marek B, Kajdaniuk D, Nowak M, Glogowska-Szelag J, Foltyn W, Strzelczyk J: Serum concentrations of leptin, adiponectin, and interleukin-6 in postmenopausal women with Hashimoto's thyroiditis. *Endokrynol Pol* 2010; 61(1): 112-116.
211. Taddei S, Caraccio N, Virdis A, Dardano A, Versari D, Ghiadoni L, Ferrannini E, Salvetti A, Monzani F: Low-grade systemic inflammation causes endothelial dysfunction in patients with Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(12): 5076-5082.
212. Libby P: Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420(6917): 868-874.
213. Auer J, Berent R, Weber T, Lassnig E, Eber B: Thyroid function is associated with presence and severity of coronary atherosclerosis. *Clin Cardiol* 2003; 26(12): 569-573.
214. Nagata S, Golstein P: The Fas death factor. *Science* 1995; 267(5203): 1449-1456.
215. Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM: An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997; 277(5327): 815-818.
216. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM: The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 1997; 276(5309): 111-113.
217. Wang SH, Bretz JD, Phelps E, Mezosi E, Arscott PL, Utsugi S, Baker JR, Jr.: A unique combination of inflammatory cytokines enhances apoptosis of thyroid follicular cells and transforms nondestructive to destructive thyroiditis in experimental autoimmune thyroiditis. *J Immunol* 2002; 168(5): 2470-2474.
218. Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, Tsuboi M, Kawabe Y, Ishikawa N, Ito K, Nagataki S: Thyroid-stimulating hormone inhibits Fas antigen-mediated apoptosis of human thyrocytes in vitro. *Endocrinology* 1996; 137(8): 3163-3169.
219. Bretz JD, Arscott PL, Myc A, Baker JR, Jr.: Inflammatory cytokine regulation of Fas-mediated apoptosis in thyroid follicular cells. *J Biol Chem* 1999; 274(36): 25433-25438.
220. Bechtner G, Froschl H, Sachse A, Schopohl D, Gartner R: Induction of apoptosis in porcine thyroid follicles by transforming growth factor beta1 and epidermal growth factor. *Biochimie* 1999; 81(4): 315-320.
221. Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, Ruberti G, Bagnasco M, Testi R, Galluzzo A: Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 1997; 275(5302): 960-963.
222. Kaczmarek E, Lacka K, Jarmolowska-Jurczyszyn D, Sidor A, Majewski P: Changes of B and T lymphocytes and selected apoptosis markers in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Pathol* 2011; 64(7): 626-630.
223. Fountoulakis S, Vartholomatos G, Kolaitis N, Frilingos S, Philippou G, Tsatsoulis A: HLA-DR expressing peripheral T regulatory cells in newly diagnosed patients with different forms of autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 2008; 18(11): 1195-1200.
224. Bossowski A, Czarnocka B, Stasiak-Barmuta A, Bardadin K, Urban M, Dadan J: [Analysis of Fas, FasL and Caspase-8 expression in thyroid gland in young patients

- with immune and non-immune thyroid diseases]. *Endokrynol Pol* 2007; 58(4): 303-313.
225. Xu WC, Chen SR, Huang JX, Zheng ZC, Chen LX, Lin JJ, Li YG: Expression and distribution of S-100 protein, CD83 and apoptosis-related proteins (Fas, FasL and Bcl-2) in thyroid tissues of autoimmune thyroid diseases. *Eur J Histochem* 2007; 51(4): 291-300.
 226. Wang CY, Zhong WB, Chang TC, Tsai YF: Circulating soluble Fas ligand correlates with disease activity in Graves' hyperthyroidism. *Metabolism* 2002; 51(6): 769-773.
 227. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD: Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994; 263(5154): 1759-1762.
 228. Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S: Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med* 1997; 186(12): 2045-2050.
 229. Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K, Yagita H: Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* 1995; 182(6): 1777-1783.
 230. Askenasy N, Yolcu ES, Yaniv I, Shirwan H: Induction of tolerance using Fas ligand: a double-edged immunomodulator. *Blood* 2005; 105(4): 1396-1404.
 231. Hiromatsu Y, Bednarczuk T, Soyejima E, Miyake I, Yang D, Fukazawa H, Nonaka K: Increased serum soluble Fas in patients with Graves' disease. *Thyroid* 1999; 9(4): 341-345.
 232. Feldkamp J, Pascher E, Schott M, Goretzki P, Seissler J, Scherbaum WA: Soluble Fas is increased in hyperthyroidism independent of the underlying thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(9): 4250-4253.
 233. Ohtsuka K, Hashimoto M: Serum levels of soluble Fas in patients with Graves' ophthalmopathy. *Br J Ophthalmol* 2000; 84(1): 103-106.
 234. Mysliwiec J, Kretowski A, Stepień A, Okłota M, Kinałska I: [Serum Fas in patients with Graves' ophthalmopathy as a marker of activity of the ocular inflammatory infiltration]. *Pol Merkur Lekarski* 2004; 17(100): 368-370.
 235. Maeda K, Ohara Y, Hashimoto M, Ohguro H: Analysis of sFas IL-6 levels in thyroid-associated ophthalmopathy: Pre- or poststeroid pulse treatment. *Clin Ophthalmol* 2008; 2(3): 609-612.
 236. Andrikoula M, Kolaitis N, Vartholomatos G, Tsatsoulis A: Serum levels of soluble fas in patients with multinodular goiter. *Immunol Invest* 2009; 38(5): 398-407.
 237. Takeda K, Ohara E, Kaneda T, Hashimoto K, Sasaki M: [Increased serum soluble Fas ligand in hyperthyroid Graves' disease]. *Rinsho Byori* 1999; 47(10): 961-965.
 238. Kolomecki K, Maciaszczyk P, Stepień H, Stepień T, Kuzdak K, Ulanska J: P53 concentration and soluble FasL (sFasL) serum level as indicators of apoptosis in patients with benign and malignant thyroid tumors. *Bratisl Lek Listy* 2005; 106(10): 297-300.

239. Mysliwiec J, Okota M, Nikolajuk A, Gorska M: Soluble Fas, Fas ligand and Bcl-2 in autoimmune thyroid diseases: relation to humoral immune response markers. *Adv Med Sci* 2006; 51: 119-122.
240. Kandror VI, Babkina IV, Krainova SI, Kavtaradze SR, Kushlinskii NE: Increase in serum concentration of FAS ligand as a possible mechanism for antithyroid cytotoxicity during autoimmune thyroid diseases. *Bull Exp Biol Med* 2004; 138(1): 37-39.
241. Bassett JH, O'Shea PJ, Sriskantharajah S, Rabier B, Boyde A, Howell PG, Weiss RE, Roux JP, Malaval L, Clement-Lacroix P, Samarut J, Chassande O, Williams GR: Thyroid hormone excess rather than thyrotropin deficiency induces osteoporosis in hyperthyroidism. *Mol Endocrinol* 2007; 21(5): 1095-1107.
242. Miura M, Tanaka K, Komatsu Y, Suda M, Yasoda A, Sakuma Y, Ozasa A, Nakao K: A novel interaction between thyroid hormones and 1,25(OH)(2)D(3) in osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291(4): 987-994.
243. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89(2): 309-319.
244. Baud'huin M, Duplomb L, Ruiz Velasco C, Fortun Y, Heymann D, Padrines M: Key roles of the OPG-RANK-RANKL system in bone oncology. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007; 7(2): 221-232.
245. Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Redini F, Heymann D: RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64(18): 2334-2350.
246. Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, Ueno Y, Shinki T, Gillespie MT, Martin TJ, Higashio K, Suda T: Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* 2000; 141(9): 3478-3484.
247. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS: osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12(9): 1260-1268.
248. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D: The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15(6): 457-475.
249. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Spronk HM, Vermeer C, Daemen MJ: Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(12): 1998-2003.
250. Kiechl S, Schett G, Wenning G, Redlich K, Oberhollenzer M, Mayr A, Santer P, Smolen J, Poewe W, Willeit J: Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation* 2004; 109(18): 2175-2180.

251. Browner WS, Lui LY, Cummings SR: Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(2): 631-637.
252. Jono S, Ikari Y, Shioi A, Mori K, Miki T, Hara K, Nishizawa Y: Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* 2002; 106(10): 1192-1194.
253. Kahaly GJ: Cardiovascular and atherogenic aspects of subclinical hypothyroidism. *Thyroid* 2000; 10(8): 665-679.
254. Hak AE, Pols HA, Visser TJ, Drexhage HA, Hofman A, Witteman JC: Subclinical hypothyroidism is an independent risk factor for atherosclerosis and myocardial infarction in elderly women: the Rotterdam Study. *Ann Intern Med* 2000; 132(4): 270-278.
255. Guang-da X, Hui-ling S, Zhi-song C, Lin-shuang Z: Changes in plasma concentrations of osteoprotegerin before and after levothyroxine replacement therapy in hypothyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(10): 5765-5768.
256. Giaginis C, Papadopouli A, Zira A, Katsargyris A, Klonaris C, Theocharis S: Correlation of plasma osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of the nuclear factor kappaB ligand (RANKL) levels with clinical risk factors in patients with advanced carotid atherosclerosis. *Med Sci Monit* 2012; 18(10): CR597-604.
257. Olesen P, Ledet T, Rasmussen LM: Arterial osteoprotegerin: increased amounts in diabetes and modifiable synthesis from vascular smooth muscle cells by insulin and TNF-alpha. *Diabetologia* 2005; 48(3): 561-568.
258. Anand DV, Lahiri A, Lim E, Hopkins D, Corder R: The relationship between plasma osteoprotegerin levels and coronary artery calcification in uncomplicated type 2 diabetic subjects. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47(9): 1850-1857.
259. Reid P, Holen I: Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG). *Eur J Cell Biol* 2009; 88(1): 1-17.
260. Holen I, Cross SS, Neville-Webbe HL, Cross NA, Balasubramanian SP, Croucher PI, Evans CA, Lippitt JM, Coleman RE, Eaton CL: Osteoprotegerin (OPG) expression by breast cancer cells in vitro and breast tumours in vivo--a role in tumour cell survival? *Breast Cancer Res Treat* 2005; 92(3): 207-215.
261. Holen I, Croucher PI, Hamdy FC, Eaton CL: Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62(6): 1619-1623.
262. Pettersen I, Bakkelund W, Smedsrod B, Sveinbjornsson B: Osteoprotegerin is expressed in colon carcinoma cells. *Anticancer Res* 2005; 25(6B): 3809-3816.
263. Cross SS, Yang Z, Brown NJ, Balasubramanian SP, Evans CA, Woodward JK, Neville-Webbe HL, Lippitt JM, Reed MW, Coleman RE, Holen I: Osteoprotegerin (OPG)--a potential new role in the regulation of endothelial cell phenotype and tumour angiogenesis? *Int J Cancer* 2006; 118(8): 1901-1908.
264. Isaia GC, Roggia C, Gola D, Stefano MD, Gallone G, Aimo G, Ardisson P, Mussetta M: Bone turnover in hyperthyroidism before and after thyrostatic management. *J Endocrinol Invest* 2000; 23(11): 727-731.

265. Pantazi H, Papapetrou PD: Changes in parameters of bone and mineral metabolism during therapy for hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(3): 1099-1106.
266. Mochizuki Y, Banba N, Hattori Y, Monden T: Correlation between serum osteoprotegerin and biomarkers of bone metabolism during anti-thyroid treatment in patients with Graves' disease. *Horm Res* 2006; 66(5): 236-239.
267. Mikosch P, Igerc I, Kudlacek S, Woloszczuk W, Gallowitsch HJ, Kresnik E, Stettner H, Grimm G, Lind P, Pietschmann P: Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin in men with thyroid cancer. *Eur J Clin Invest* 2006; 36(8): 566-573.
268. Skoumal M, Kolarz G, Haberhauer G, Woloszczuk W, Hawa G, Klingler A: Osteoprotegerin and the receptor activator of NF-kappa B ligand in the serum and synovial fluid. A comparison of patients with longstanding rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatol Int* 2005; 26(1): 63-69.
269. Romas E, Gillespie MT, Martin TJ: Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone* 2002; 30(2): 340-346.
270. Masi L, Simonini G, Piscitelli E, Del Monte F, Giani T, Cimaz R, Vierucci S, Brandi ML, Falcini F: Osteoprotegerin (OPG)/RANK-L system in juvenile idiopathic arthritis: is there a potential modulating role for OPG/RANK-L in bone injury? *J Rheumatol* 2004; 31(5): 986-991.
271. Rouster-Stevens KA, Langman CB, Price HE, Seshadri R, Shore RM, Abbott K, Pachman LM: RANKL:osteoprotegerin ratio and bone mineral density in children with untreated juvenile dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 2007; 56(3): 977-983.
272. Sylvester FA, Davis PM, Wyzga N, Hyams JS, Lerer T: Are activated T cells regulators of bone metabolism in children with Crohn disease? *J Pediatr* 2006; 148(4): 461-466.
273. Rosso DA, Karis J, Braier JL, Henter JI, Fadeel B: Elevated serum levels of the decoy receptor osteoprotegerin in children with langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Res* 2006; 59(2): 281-286.
274. Kudlacek S, Schneider B, Woloszczuk W, Pietschmann P, Willvonseder R: Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone* 2003; 32(6): 681-686.
275. Galluzzi F, Stagi S, Salti R, Toni S, Piscitelli E, Simonini G, Falcini F, Chiarelli F: Osteoprotegerin serum levels in children with type 1 diabetes: a potential modulating role in bone status. *Eur J Endocrinol* 2005; 153(6): 879-885.
276. Granchi D, Garaventa A, Amato I, Paolucci P, Baldini N: Plasma levels of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in patients with neuroblastoma. *Int J Cancer* 2006; 119(1): 146-151.
277. Simonini G, Masi L, Giani T, Piscitelli E, Cimaz R, Vierucci S, Brandi ML, Falcini F: Osteoprotegerin serum levels in Kawasaki disease: an additional potential marker in predicting children with coronary artery involvement. *J Rheumatol* 2005; 32(11): 2233-2238.

278. Buzi F, Maccarinelli G, Guaragni B, Ruggeri F, Radetti G, Meini A, Mazzolari E, Cocchi D: Serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factors κ B (RANKL) concentrations in normal children and in children with pubertal precocity, Turner's syndrome and rheumatoid arthritis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60(1): 87-91.
279. Honsawek S, Chaiwatanarat T, Vejchapipat P, Chongsrisawat V, Thawornsuk N, Poovorawan Y: Relationships between OPG, RANKL, bone metabolism, and bone mineral density in biliary atresia. *Pediatr Surg Int* 2009; 25(3): 261-267.
280. Gannage-Yared MH, Yaghi C, Habre B, Khalife S, Noun R, Germanos-Haddad M, Trak-Smayra V: Osteoprotegerin in relation to body weight, lipid parameters insulin sensitivity, adipocytokines, and C-reactive protein in obese and non-obese young individuals: results from both cross-sectional and interventional study. *Eur J Endocrinol* 2008; 158(3): 353-359.
281. Rogers A, Eastell R: Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor κ B ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(11): 6323-6331.
282. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveiras-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM: OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397(6717): 315-323.

10. SPIS TABEL I RYCIN

Tabela 1. Polimorfizmy genetyczne związane z chorobami tarczycy.....	16
Tabela 2. Fenotypowa charakterystyka choroby Hashimoto i Gravesa-Basedowa.....	27
Tabela 3. Parametry reakcji ELISA zestawów BenderMedSystem i Biomedica.....	59
Tabela 4. Testy normalności rozkładu i istotności różnic pomiędzy badanymi grupami.....	63
Tabela 5. Testy normalności rozkładu i istotności różnic względem płci w grupie dzieci nadczynnością tarczycy.....	65
Tabela 6. Testy normalności rozkładu i istotności różnic względem płci w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	66
Tabela 7. Testy normalności rozkładu i istotności różnic względem płci w grupie kontrolnej.....	67
Tabela 8. Struktura płci badanych grup.....	68
Tabela 9. Zestawienie wyników badanych grup dzieci.....	69
Tabela 10. Zestawienie wyników grupy dzieci z nadczynnością tarczycy, podział pod względem płci.....	71
Tabela 11. Zestawienie wyników – grupa dzieci z niedoczynnością tarczycy, podział pod względem płci.....	72
Tabela 12. Zestawienie wyników – grupa kontrolna, podział pod względem płci.....	73
Tabela 13. Zestawienie różnic w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy w zależności od płci.....	97
Tabela 14. Zestawienie różnic w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy w zależności od płci.....	98
Tabela 15. Istotność różnic w grupie kontrolnej w zależności od płci.....	99
Tabela 16. Zestawienie istotności różnic wyników między grupami dzieci.....	101
Tabela 17. Korelacje nieparametryczne r-Spearman'a i ich istotność – badane cytokiny w grupach dzieci.....	108
Tabela 18. Korelacje nieparametryczne r-Spearman'a i ich istotność – parametry stanu odżywienia, tyreometaboliczne i badane cytokiny w grupach dzieci.....	115
Tabela 19. Podsumowanie analizy ROC grupy dzieci z nadczynnością tarczycy	122
Tabela 20. Podsumowanie analizy ROC grupy dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	124
Tabela 21. Podsumowanie analizy ROC grupy dzieci z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy.....	126
Rycina 1. Model wiązania przeciwciał TSHR obecnych w autoimmunologicznej chorobie tarczycy.....	12
Rycina 2. Patogeneza limfocytnego zapalenia tarczycy typu Hashimoto (HT) i choroby Gravesa-Basedowa (GD).....	15

Rycina 3. Mechanizm patogenezy AITD z udziałem czynników genetycznych i nie-genetycznych.....	21
Rycina 4. Mechanizm autoimmunizacji tarczycy w HT.....	25
Rycina 5. Regulacja apoptozy w tyreocycie.....	33
Rycina 6. Ligandy i receptory śmierci FasL i TRAIL.....	36
Rycina 7. Model apoptozy Fas/FasL-zależnej w HT i GD.....	46
Rycina 8. Rola szlaku OPG/RANKL/RANK w regulacji gospodarki kostnej.....	48
Rycina 9. Prawidłowy obraz normoechogeniczny, jednorodny, gruczołu tarczowego.....	51
Rycina 10. Nieprawidłowy obraz hipoechogeniczny gruczołu tarczowego.....	51
Wykres 1. Struktura pęci badanych grup – wykres słupkowy.....	68
Wykres 2. Histogram wieku w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	74
Wykres 3. Histogram wieku w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	74
Wykres 4. Histogram wieku w grupie kontrolnej.....	75
Wykres 5. Histogram BMI w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	75
Wykres 6. Histogram BMI w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	75
Wykres 7. Histogram BMI w grupie kontrolnej.....	76
Wykres 8. Histogram BMI SDS w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	76
Wykres 9. Histogram BMI SDS w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	76
Wykres 10. Histogram BMI SDS w grupie kontrolnej.....	77
Wykres 11. Histogram wskaźnika Cole'a w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	77
Wykres 12. Histogram wskaźnika Cole'a w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	77
Wykres 13. Histogram wskaźnika Cole'a w grupie kontrolnej.....	78
Wykres 14. Histogram stężenia TSH w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	78
Wykres 15. Histogram stężenia TSH w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	78
Wykres 16. Histogram stężenia TSH w grupie kontrolnej.....	79
Wykres 17. Histogram stężenia fT4 w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	79
Wykres 18. Histogram stężenia fT4 w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	79
Wykres 19. Histogram stężenia fT4 w grupie kontrolnej.....	80
Wykres 20. Histogram stężenia fT3 w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	80
Wykres 21. Histogram stężenia fT3 w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	80
Wykres 22. Histogram stężenia fT3 w grupie kontrolnej.....	81
Wykres 23. Histogram stężenia TRAb w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	81
Wykres 24. Histogram stężenia TRAb w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	81
Wykres 25. Histogram stężenia TRAb w grupie kontrolnej.....	82
Wykres 26. Histogram stężenia ATG w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	82
Wykres 27. Histogram stężenia ATG w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	82
Wykres 28. Histogram stężenia ATG w grupie kontrolnej.....	83

Wykres 29. Histogram stężenia ATPO w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	83
Wykres 30. Histogram stężenia ATPO w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	83
Wykres 31. Histogram stężenia ATPO w grupie kontrolnej.....	84
Wykres 32. Histogram stężenia IL-6 w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	84
Wykres 33. Histogram stężenia IL-6 w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	84
Wykres 34. Histogram stężenia IL-6 w grupie kontrolnej.....	85
Wykres 35. Histogram stężenia TNF- α w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	85
Wykres 36. Histogram stężenia TNF- α w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	85
Wykres 37. Histogram stężenia TNF- α w grupie kontrolnej.....	86
Wykres 38. Histogram stężenia IL-1 β w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	86
Wykres 39. Histogram stężenia IL-1 β w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	86
Wykres 40. Histogram stężenia IL-1 β w grupie kontrolnej.....	87
Wykres 41. Histogram stężenia TRAIL w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	87
Wykres 42. Histogram stężenia TRAIL w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	87
Wykres 43. Histogram stężenia TRAIL w grupie kontrolnej.....	88
Wykres 44. Histogram stężenia OPG w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	88
Wykres 45. Histogram stężenia OPG w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	88
Wykres 46. Histogram stężenia OPG w grupie kontrolnej.....	89
Wykres 47. Histogram stężenia sRANKL w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	89
Wykres 48. Histogram stężenia sRANKL w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	89
Wykres 49. Histogram stężenia sRANKL w grupie kontrolnej.....	90
Wykres 50. Histogram stężenia sFasL w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	90
Wykres 51. Histogram stężenia sFasL w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	90
Wykres 52. Histogram stężenia sFasL w grupie kontrolnej.....	91
Wykres 53. Różnica stężenia sRANKL w grupie kontrolnej pomiędzy dziewczynkami i chłopcami.....	100
Wykres 54. Różnice stężenia TSH między badanymi grupami.....	102
Wykres 55. Różnice stężenia fT4 między badanymi grupami.....	103
Wykres 56. Różnice stężenia fT3 między badanymi grupami.....	103
Wykres 57. Różnice stężenia TRAb między badanymi grupami.....	103
Wykres 58. Różnice stężenia ATG między badanymi grupami.....	104
Wykres 59. Różnice stężenia ATPO między badanymi grupami.....	104
Wykres 60. Różnice stężenia IL-1 β między badanymi grupami.....	106
Wykres 61. Różnice stężenia TRAIL między badanymi grupami.....	106
Wykres 62. Różnice stężenia OPG między badanymi grupami.....	106
Wykres 63. Różnice stężenia sFasL między badanymi grupami.....	107

Wykres 64. Dodatnia korelacja nieparametryczna IL-6 i TNF- α w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	109
Wykres 65. Dodatnia korelacja nieparametryczna TRAIL i TNF- α w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	109
Wykres 66. Dodatnia korelacja nieparametryczna OPG i TNF- α w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	109
Wykres 67. Dodatnia korelacja nieparametryczna sRANKL i TNF- α w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	110
Wykres 68. Dodatnia korelacja nieparametryczna sFasL i TNF- α w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	110
Wykres 69. Dodatnia korelacja nieparametryczna OPG i IL-6 w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	110
Wykres 70. Dodatnia korelacja nieparametryczna OPG i sRANKL w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	111
Wykres 71. Dodatnia korelacja nieparametryczna IL-1 β i TNF- α w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	112
Wykres 72. Dodatnia korelacja nieparametryczna IL-1 β i OPG w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	112
Wykres 73. Dodatnia korelacja nieparametryczna TRAIL i OPG w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	112
Wykres 74. Dodatnia korelacja nieparametryczna TRAIL i sRANKL w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	113
Wykres 75. Dodatnia korelacja nieparametryczna OPG i sFasL w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	113
Wykres 76. Ujemna korelacja nieparametryczna IL-1 β i TNF- α w grupie kontroln.....	114
Wykres 77. Dodatnia korelacja nieparametryczna sFasL i sRANKL w grupie kontrolnej....	114
Wykres 78. Dodatnia korelacja nieparametryczna IL-1 β i ATPO w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	116
Wykres 79. Dodatnia korelacja nieparametryczna TRAIL i fT4 w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	116
Wykres 80. Dodatnia korelacja nieparametryczna TRAIL i TRAb w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	116
Wykres 81. Dodatnia korelacja nieparametryczna sRANKL i ATPO w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	117
Wykres 82. Dodatnia korelacja nieparametryczna sFasL i BMI SDS w grupie dzieci z nadczynnością tarczycy.....	117

Wykres 83. Dodatnia korelacja nieparametryczna TNF- α i ATPO w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	118
Wykres 84. Dodatnia korelacja nieparametryczna TRAIL i fT4 w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	118
Wykres 85. Dodatnia korelacja nieparametryczna TRAIL i fT3 w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	118
Wykres 86. Ujemna korelacja nieparametryczna sRANKL i TSH w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	119
Wykres 87. Dodatnia korelacja nieparametryczna sRANKL i fT4 w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	119
Wykres 88. Dodatnia korelacja nieparametryczna sRANKL i fT3 w grupie dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	119
Wykres 89. Ujemna korelacja nieparametryczna TRAIL i ATPO w grupie kontrolnej.....	120
Wykres 90. Dodatnia korelacja nieparametryczna sRANKL i wieku pacjentów w grupie kontrolnej.....	120
Wykres 91. Krzywa ROC stężenia TRAIL, grupa dzieci z nadczynnością tarczycy vs. grupa kontrolna.....	122
Wykres 92. Krzywa ROC stężenia OPG, grupa dzieci z nadczynnością tarczycy vs. grupa kontrolna.....	123
Wykres 93. Krzywa ROC stężenia TNF- α , grupa dzieci z niedoczynnością tarczycy vs. grupa kontrolna.....	124
Wykres 94. Krzywa ROC stężenia IL-1 β , grupa dzieci z niedoczynnością tarczycy vs. grupa kontrolna.....	125
Wykres 95. Krzywa ROC stężenia sFasL, grupa dzieci z niedoczynnością tarczycy vs. grupa kontrolna.....	125
Wykres 96. Krzywa ROC stężenia IL-1 β , grupa dzieci z niedoczynnością tarczycy vs. dzieci z nadczynnością tarczycy.....	127
Wykres 97. Krzywa ROC stężenia sFasL, grupa dzieci z niedoczynnością tarczycy vs. dzieci z nadczynnością tarczycy.....	127
Wykres 98. Krzywa ROC stężenia TRAIL, grupa dzieci z nadczynnością tarczycy vs. dzieci z niedoczynnością tarczycy.....	128