Streszczenie pracy doktorskiej lek. Aleksandry Furtak

Promotor: dr hab. Anna Wędrychowicz, prof. UJ

Temat pracy doktorskiej: *„Disorders of thyroid function and morphology in children and adolescents after biological treatment"*

***(„Zaburzenia czynności i morfologii gruczołu tarczowego u dzieci i młodzieży po leczeniu biologicznym")* – cykl publikacji**

Wstęp:

Praca 1 i 2:

Czynnik martwicy nowotworów alfa (tumor necrosis factor alfa; TNF-alfa), jest cytokiną mającą kluczowe znaczenie w przebiegu reakcji zapalnych i immunologicznych. Produkowany jest głównie przez monocyty oraz makrofagi, ale jego źródłem mogą być również inne komórki, w tym komórki tarczycy [10,11].

Niepodważalny wpływ TNF-alfa na układ immunologiczny powoduje, że jest on kluczowym czynnikiem w patogenezie wielu chorób, w tym autoimmunizacyjnych. Fakt ten, stał się podstawą do poszukiwania nowych możliwości terapeutycznych dla pacjentów dotkniętych takimi chorobami, w tym na przykład nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit (inflammatory bowel disease; IBD) [12]. W konsekwencji powstały leki określane mianem anty-TNF-alfa, których głównym zadaniem jest bezpośrednie zmniejszenie stężenia TNF-alfa i przez to zahamowanie kaskady zjawisk zachodzących w przebiegu jego działania [13].

Inhibitory TNF-alfa to przeciwciała monoklonalne, fragmenty przeciwciał lub białka fuzyjne. Do tej grupy leków biologicznych należy między innymi Infliksimab (IFX), który jest monoklonalnym, chimerycznym, ludzko-mysim (75%:25% struktury białka) przeciwciałem klasy IgG1 o masie cząsteczkowej 149 kDa [13].

TNF-alfa bierze także udział w patogenezie zaburzeń czynności tarczycy, w tym AITD [14, 15]. Zgodnie z dostępnym piśmiennictwem, stężenie mRNA dla TNF-alfa i TNF-alfa w obrębie tkanki tarczycy u osób z AITD i innymi zaburzeniami czynności gruczołu tarczowego, jest zdecydowanie wyższe w porównaniu do osób bez tych zaburzeń [10].

Jak wiadomo z literatury, bardzo często choroby w których terapii wykorzystywany jest anty-TNF-alfa związane są z większym ryzykiem wystąpienia innej autoimmunizacyjnej choroby, w tym AITD, w porównaniu z populacją ogólną. Należy jednak podkreślić, że dane na temat częstszego występowania AITD u pacjentów z IBD w porównaniu z populacją ogólną są rozbieżne i dotyczą, zgodnie z naszą wiedzą, przede wszystkim populacji pacjentów dorosłych [16-19].

Biorąc pod uwagę wyżej podane informacje na temat roli TNF-alfa w etiopatogenezie zaburzeń czynności tarczycy, należałoby się spodziewać, że terapia anty-TNF-alfa stosowana z powodu innej choroby, powinna mieć działanie protekcyjne przed ewentualnym rozwojem autoimmunizacyjnej choroby tarczycy, a w sytuacji jej obecności powinna wykazywać działanie

lecznicze.

Pomimo tego, że badania nad lekami biologicznymi anty-TNF-alfa sięgają lat 90-tych XX wieku, ich wyniki oceniające wpływ tej terapii na czynność czy morfologię gruczołu tarczowego dotyczą populacji pacjentów dorosłych i pozostają niejednoznaczne [4-6].

Z uwagi na coraz szersze zastosowanie terapii anty-TNF-alfa także w populacji pediatrycznej - leki te wykorzystywane są z dużą efektywnością w terapii IBD, uznaliśmy za zasadne objęcie badaniami także tej grupy pacjentów, mając na uwadze kluczową rolę eutyreozy w prawidłowym rozwoju dzieci i młodzieży.

Rozpoznanie AITD opiera się na wykazaniu obecności krążących przeciwciał przeciwko antygenom tarczycy (głównie tyreoperoksydazie i tyreoglobulinie) oraz stwierdzeniu obniżonej echogeniczności gruczołu tarczowego w badaniu ultrasonograficznym (ultrasonography; USG), u pacjenta z prawidłowymi lub nieprawidłowymi poziomami hormonów tarczycy [20]. W opinii wielu ekspertów, ocena ultrasonograficzna gruczołu tarczowego jest skuteczniejszym narzędziem w diagnostyce i rokowaniu w AITD niż badanie obecności przeciwciał krążących we krwi [21-24].

Nierozpoznane zaburzenia czynności tarczycy mogą wpływać negatywnie na przebieg CD. W świetle tych danych, kluczowe jest poznanie wpływu terapii anty- TNF-alfa na czynność i morfologię gruczołu tarczowego oraz opracowanie metod, które umożliwią wczesne rozpoznanie ewentualnych zaburzeń.

Zgodnie z naszą wiedzą, jedyne dotychczas opublikowane badanie dotyczące jednocześnie oceny częstości występowania zaburzeń czynności tarczycy u pacjentów z IBD i wpływu terapii anty-TNF-alfa na funkcję tarczycy, dotyczyło populacji osób dorosłych i nie obejmowało oceny gruczołu tarczowego w badaniu ultrasonograficznym [5].

Praca 3:

Choroby spichrzeniowe, genetycznie uwarunkowane zaburzenia, spowodowane niedoborem określonego enzymu prowadzą do ogólnoustrojowej akumulacji niezmetabolizowanych substancji. Obecnie, wiele z tych schorzeń można leczyć przyczynowo za pomocą enzymatycznej terapii zastępczej [7]. Na świecie ERT została po raz pierwszy opracowana dla choroby Gauchera w latach 90-tych XX wieku. W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć pewne dane dotyczące wpływu ERT na dysfunkcję wielu narządów i układów. Jednak funkcja i morfologia gruczołów dokrewnych, w tym tarczycy w chorobach spichrzeniowych, oraz wpływ ERT na ich czynność nie zostały dokładnie zbadane [25-29]. Biorąc pod uwagę wysoki stopień unaczynienia i niski wskaźnik proliferacji gruczołów dokrewnych, wydają się one podatne na akumulację substancji niezmetabolizowanych, które mogą zaburzać ich funkcję lub morfologię. Jest to szczególnie ważne w populacji pediatrycznej, ponieważ jak wiadomo, prawidłowa czynność gruczołu tarczowego jest niezbędna do prawidłowego rozwoju dzieci i młodzieży. W obrazie klinicznym chorób

spichrzeniowych często występują zaburzenia wynikające z neurodegeneracji, które mogłyby być potęgowane przez brak eutyreozy. W świetle tych danych, wydaje się zasadne, poznanie wpływu ERT na funkcję i morfologię gruczołu tarczowego i określenie jej spodziewanego działania ochronnego na ten gruczoł.

Cele pracy:

Pierwszym, wspólnym celem cyklu trzech prac była ocena wpływu leczenia biologicznego na czynność i morfologię gruczołu tarczowego u dzieci i młodzieży. Drugim, wspólnym celem cyklu trzech prac było założenie, że uzyskane wyniki, poprzez wczesną detekcję potencjalnych zaburzeń i wprowadzenie odpowiedniego ich monitorowania czy leczenia, pozwolą na prawidłowy rozwój dzieci i młodzieży.

Praca 1:

Celem szczegółowym ***pracy 1*** była, oparta na przeglądzie literatury, analiza możliwego wpływu terapii z zastosowaniem anty-TNF-alpha, stosowanej w chorobach zapalnych i immunologicznych, na czynność tarczycy i rozwój AITD.

Praca 2:

Celem szczegółowym ***pracy 2*** była ocena wpływu terapii z zastosowaniem Infliksimabu na rozwój zaburzeń czynności i morfologii gruczołu tarczowego u dzieci i młodzieży z CD. Ponadto celem tego badania była ocena przydatność ultrasonografii do określenia ryzyka wystąpienia AITD u pacjentów pediatrycznych z CD.

Praca 3:

Celem szczegółowym ***pracy 3*** było przeprowadzenie wstępnych badań własnych oraz przegląd piśmiennictwa, dotyczące oceny funkcji i morfologii tarczycy u pacjentów pediatrycznych leczonych enzymatyczną terapią zastępczą z powodu chorób spichrzeniowych.

Materiał i metody:

Praca 1:

Przegląd piśmiennictwa oparty na publikacjach umieszczonych w bazie PubMed. Podstawowym kryterium wyszukiwania prac do analizy, była zawarta w nich ocena wpływu terapii z zastosowaniem anty-TNF-alpha, stosowanej w chorobach zapalnych i immunologicznych, na czynność tarczycy i rozwój AITD.

Ostatecznie wybrano 10 prac, opublikowanych w latach 2001 – 2018. Wyniki przeglądu piśmiennictwa zostały przedstawione w postaci tabeli, w której w odrębnych kolumnach, wyodrębniono publikacje wskazujące na pozytywny, negatywny oraz neutralny wpływ terapii anty-TNF-alfa stosowanej w chorobach zapalnych i immunologicznych na czynność tarczycy i rozwój AITD.

Praca 2:

Do badania włączono 61 pacjentów z CD, leczonych w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii i Żywienia, Katedry Pediatrii, Instytutu Pediatrii, UJCM, bez żadnych zaburzeń czynności lub morfologii tarczycy w wywiadzie. Trzydziestu sześciu pacjentów było leczonych Infliksimabem (grupa IFX), podczas gdy 25 pacjentów (grupa kontrolna) nigdy nie otrzymywało żadnego leku biologicznego. Badanie zatwierdziła Lokalna Komisja Bioetyczna (nr 1072.6120.57.2019 z dnia 28.03.2019). Rodzice i pacjenci powyżej 16 roku życia podpisali świadomą zgodę na udział w badaniu.

W grupie IFX było 18 dziewcząt (średnia wieku 14,5 ± 2,3 lat) i 18 chłopców (średnia wieku 14,4 ± 4,4 lat). Średni czas trwania CD u dziewcząt wynosił 52,6 ± 31,5 miesiąca, średni czas trwania terapii IFX wynosił 43,8 ± 30,1 miesiąca. Średni czas trwania CD u chłopców wynosił 53,6 ± 31,7 miesiąca, średni czas trwania terapii IFX wynosił 34 ± 19,2 miesiąca.

W grupie kontrolnej było 10 dziewcząt (średnia wieku 13,9 ± 2,8 lat) i 15 chłopców (średnia wieku 15,2 ± 1,8 lat). Średni czas trwania CD u dziewcząt wynosił 26,3 ± 32,5 miesiąca, u chłopców 24,2 ± 22 miesiące.

U każdego pacjenta oznaczono stężenie w surowicy hormonu tyreotropowego (thyroid stimulating hormone; TSH), trijodotyroniny (free triiodothyronine; fT3), tyroksyny (thyroxine; fT4). Ponadto u każdego pacjenta oznaczono miano przeciwciał przeciwko peroksydazie tarczycowej (anti-thyroid peroxidase antibody; ATPO), przeciwko receptorowi TSH (anti-TSH receptor antibody; TRAb), przeciwko tyreoglobulinie (anti-thyroglobulin antibody; aTG). Stężenia hormonów TSH, fT3 i fT4 mierzono za pomocą bezpośredniego testu chemiluminescencji (Siemens, USA). Miana przeciwciał ATPO, aTG i TRAb oznaczono przy użyciu metody immunochemicznej ze znacznikiem izotopowym (Brahms, Niemcy).

Każdy pacjent miał wykonane badanie ultrasonograficzne tarczycy. Badanie obejmowało pomiar obu płatów tarczycy w trzech wymiarach oraz pomiar grubości cieśni tarczycy, ocenę echogeniczności miąższu oraz obecności zmian ogniskowych (przy użyciu zarówno skali szarości, jak i techniki kolor Doppler).

Analiza statystyczna została przeprowadzona za pomocą Dell Statistica 13.1 Pakiet 64-bitowy (StatSoft, Kraków, Polska). Zmienne zostały przedstawione jako średnia z SD. Różnice między grupą IFX a grupą kontrolną określono za pomocą testu t-Studenta. Dla wszystkich obliczeń istotność statystyczną przyjęto na poziomie $p<0,05$.

Praca 3:

Do badania włączono ośmiu pacjentów (7 chłopców, 1 dziewczynka – pacjent nr 4) z chorobami metabolicznymi leczonych ERT, pozostających pod stałą opieką Kliniki Pediatrii, Katedry Pediatrii, Instytutu Pediatrii, UJCM. Trzech pacjentów z chorobą Fabry'ego (nr 1 w wieku

17 lat, czas od rozpoznania 21 miesięcy, czas trwania ERT 7 miesięcy; nr 2 w wieku 9,9 lat, czas od rozpoznania 22 miesiące, czas trwania ERT 20 miesięcy; nr 3 w wieku 10 lat, czas od rozpoznania 39 miesięcy, czas trwania ERT 6 miesięcy). Trzech z chorobą Huntera (nr 6 w wieku 12,3 lat, czas od rozpoznania 148 miesięcy, czas trwania ERT 146 miesięcy; nr 7 w wieku 4,1 lat, czas od rozpoznania 46 miesięcy, czas trwania ERT 43 miesiące; nr 8 w wieku 9,3 lat, czas od rozpoznania 84 miesiące, czas trwania ERT 79 miesięcy). Dwóch z chorobą Pompego (nr 4 w wieku 6,8 lat, czas od rozpoznania 84 miesiące, czas trwania ERT 81 miesięcy; nr 5 w wieku 9,5 lat, czas od rozpoznania 26 miesięcy, czas trwania ERT 25 miesięcy). Siedmiu pacjentów nie miało żadnych zaburzeń czynności lub morfologii gruczołu tarczowego w wywiadzie, jeden pacjent (nr 2) miał rozpoznane AITD (4 lata przed chorobą Fabry'ego). Badanie zatwierdziła Lokalna Komisja Bioetyczna (nr 1072.6120.57.2019 z dnia 28.03.2019). Rodzice i pacjenci powyżej 16 roku życia podpisali świadomą zgodę na udział w badaniu.

U każdego pacjenta w trakcie ERT, oznaczono stężenie w surowicy hormonu tyreotropowego (thyroid stimulating hormone; TSH), trijodotyroniny (free triiodothyronine; fT3), tyroksyny (thyroxine; fT4). Ponadto u każdego pacjenta oznaczono miano przeciwciał przeciwko peroksydazie tarczycowej (anti-thyroid peroxidase antibody; ATPO), przeciwko receptorowi TSH (anti-TSH receptor antibody; TRAb), przeciwko tyreoglobulinie (anti-thyroglobulin antibody; aTG). Stężenia hormonów TSH, fT3 i fT4 mierzono za pomocą bezpośredniego testu chemiluminescencji (Siemens, USA). Miana przeciwciał ATPO, aTG i TRAb oznaczono przy użyciu metody immunochemicznej ze znacznikiem izotopowym (Brahms, Niemcy).

Każdy pacjent w trakcie ERT miał wykonane badanie ultrasonograficzne tarczycy. Badanie obejmowało pomiar obu płatów tarczycy w trzech wymiarach oraz pomiar grubości cieśni tarczycy, ocenę echogeniczności miąższu oraz obecności zmian ogniskowych (przy użyciu zarówno skali szarości, jak i techniki kolor Doppler).

Ponadto u trzech pacjentów z chorobą Huntera (nr 6-8) i jednego z chorobą Fabry'ego (nr 1) wykonano ponowną ocenę parametrów czynności gruczołu tarczowego (TSH, fT3, fT4), miana przeciwciał (ATPO, aTG, TRAb) oraz badanie ultrasonograficzne tarczycy (nie wykonano powtórnego USG u pacjenta nr 7) po 27 miesiącach ERT.

Analiza statystyczna została przeprowadzona za pomocą Dell Statistica 13.1 Pakiet 64-bitowy (StatSoft, Kraków, Polska). Zmienne zostały przedstawione jako średnia z SD.

Podsumowanie wyników:

<u>Praca 1:</u>

Anti-tumour necrosis factor α therapy – Does it increase the risk of thyroid disease or protect against its development?

(Pediatric Endocrinology Diabetes and Metabolism. 2020;26(3):144-149).

Chociaż badania nad biologicznymi lekami anty-TNF-alfa sięgają lat 90-tych XX wieku, to zgodnie z przytoczonymi doniesieniami, pomimo stosunkowo długiego okresu obserwacji, pytanie o wpływ terapii anty-TNF-alfa, stosowanej w innych chorobach zapalnych i immunologicznych, na czynność tarczycy i rozwój AITD, wciąż pozostaje otwarty. Jest niewiele doniesień na ten temat, dostarczają one bardzo zróżnicowanych danych i dotyczą głównie populacji pacjentów dorosłych. Ze względu na rosnącą częstość stosowania terapii anty-TNF-alfa również w populacji pediatrycznej, zasadne wydaje się przeprowadzenie badań oceniających czynność tarczycy i rozwój AITD również w tej grupie pacjentów.

Podsumowując, wnioski tej pracy stały się wstępem do prowadzonych badań i kolejnej publikacji, wchodzącej w skład niniejszej rozprawy doktorskiej, na temat wpływu terapii anty-TNF-alfa na czynność i morfologię tarczycy u dzieci i młodzieży z CD.

Praca 2:

Infliximab Therapy Could Decrease the Risk of the Development of Thyroid Disorders in Pediatric Patients With Crohn's Disease.

(Frontiers in Endocrinology. 2020;11)

W grupie IFX 6/36 pacjentów (5/18 dziewcząt, 1/18 chłopców) miało w badaniu ultrasonograficznym, nieprawidłową echogeniczność miąższu tarczycy (u trzech pacjentów stwierdzono niejednorodną echogeniczność, u dwóch nieznacznie obniżoną echogeniczność, u jednego znacznie obniżoną echogeniczność). Średni czas trwania CD u tych pacjentów wynosił 46 ± 20,31 SD miesięcy (zakres 21–72 miesięcy). Średni czas trwania terapii IFX wynosił 41 ± 17,9 SD miesięcy (zakres 21–59 miesięcy). Ponadto u 8/36 pacjentów stwierdzono obecność małych torbieli koloidowych w dolnych biegunach obu płatów tarczycy, a u jednego chłopca dwie torbielowato - lite zmiany w obu płatach tarczycy (w płacie lewym 4,5 × 4,3 × 2,1 mm; w prawym płacie 6,2 × 7,3 × 3,2 mm) – w powtórzonym po 6 miesiącach badaniu obserwowano zmniejszenie ich wymiarów i potwierdzono ich torbielowaty charakter. W grupie IFX 25/36 pacjentów miało prawidłowy obraz gruczołu tarczowego w badaniu ultrasonograficznym.

W grupie kontrolnej 11/25 pacjentów (5/10 dziewczynek, 6/15 chłopców) miało w badaniu ultrasonograficznym, nieprawidłową echogeniczność miąższu tarczycy (u czterech pacjentów stwierdzono niejednorodną echogeniczność, u siedmiu niejednorodną i znacznie obniżoną echogeniczność). Średni czas trwania choroby u tych pacjentów wynosił 28,7 ± 26,1 SD miesięcy (zakres 3–72 miesięcy). Ponadto u 9/25 pacjentów stwierdzono obecność małych torbieli koloidowych w dolnych biegunach obu płatów tarczycy. W grupie kontrolnej 13/25 pacjentów miało prawidłowy obraz gruczołu tarczowego w badaniu ultrasonograficznym.

Parametry oceniające czynność tarczycy (TSH, fT3 i fT4) pozostawały, w obu grupach, w zakresie normy. Poziomy TSH były jednak nieistotnie statystycznie niższe w grupie IFX (1.31 ± 0.75 μIU/ml) w porównaniu z grupą kontrolną (1.68 ± 0.79 μIU/ml) (p = 0,69). W przeciwieństwie, poziomy fT4 były statystycznie istotnie wyższe w grupie kontrolnej (17.17 ± 2.46 pmol/l) w porównaniu z grupą IFX (13.96 ± 1.95 pmol/l) (p < 0,001). Nie stwierdzono różnic w poziomie fT3 pomiędzy dwiema grupami.

Miana przeciwciał (ATPO, aTG, TRAb) pozostawały, w obu grupach, ujemne. U pacjentów z grupy IFX stwierdzono statystycznie istotnie mniejsze miano przeciwciał TRAb w porównaniu z grupą kontrolną (0,53 ± 0,19 IU/ml vs 0,69 ± 0,22 IU/ml; p = 0,03).

Ponadto u pacjentów z grupy kontrolnej z niejednorodnym/hipoechogenicznym miąższem tarczycy w badaniu ultrasonograficznym, stwierdzono wyższe miana TRAb w porównaniu do pacjentów z prawidłowym obrazem tarczycy w badaniu ultrasonograficznym (0,79 ± 0,23 IU/ml vs 0,59 ± 0,17 IU/ml; p = 0,042).

Podsumowując, stwierdzono 10-krotnie większą częstość występowania znacznego zmniejszenia echogeniczności miąższu gruczołu tarczowego u pacjentów nieotrzymujących leczenia biologicznego (7/25 pacjentów, tj. 28%) w porównaniu do pacjentów otrzymujących IFX (1/36, tj. 2,8%), chociaż czas trwania CD w grupie IFX był dłuższy w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto stwierdzono mniejsze stężenie TSH i miano przeciwciał TRAb u pacjentów z grupy IFX, w porównaniu z grupą kontrolną.

Powyższe dane wyraźnie sugerują prewencyjną rolę IFX w prawdopodobnym rozwoju AITD u pacjentów z CD. Ponadto, wyniki wskazują na wysoką przydatność badania ultrasonograficznego tarczycy jako narzędzia w identyfikacji pacjentów z CD, z ryzykiem rozwoju AITD.

Praca 3:

Assessment of the thyroid gland's function and morphology in paediatric patients treated with enzyme replacement therapy due to storage diseases - preliminary results of own research and the review of the literature.

(Pediatric Endocrinology Diabetes and Metabolism – praca przyjęta do publikacji)

Pośród pacjentów z chorobą Fabry'ego, u pacjenta nr 1 stwierdzono prawidłowe stężenie hormonów osi tarczycowej (ze spadkiem stężenia TSH z 2,8 do 2,36 uIU/ml, bez istotnych różnic fT3 i fT4) i ujemne miano przeciwciał przeciwtarczycowych w pierwszej i drugiej ocenie; w USG stwierdzono wyraźną poprawę (w pierwszej ocenie miąższ o nieznacznie niejednorodnej echogeniczności ze współistnieniem pojedynczych torbieli koloidowych, w drugiej ocenie echogeniczność tarczycy prawidłowa). U pacjenta nr 2, leczonego z powodu niedoczynności

tarczycy w przebiegu AITD rozpoznanej 4 lata przed rozpoznaniem choroby Fabry'ego, stwierdzono prawidłowe wyniki hormonów osi tarczycowej (podczas substytucji L-tyroksyną, 50 ug na dobę), dodatnie miano przeciwciał przeciwtarczycowych i typowy dla AITD obraz tarczycy w USG, jednak według danych lekarza prowadzącego wymagał zmniejszenia dawki substytucyjnej L-tyroksyny (z 62,5 ug do 50 ug dziennie). U pacjenta nr 3 stwierdzono prawidłowe wyniki hormonów osi tarczycowej, ujemne miano przeciwciał przeciwtarczycowych i prawidłowy obraz tarczycy w USG.

U wszystkich pacjentów z chorobą Pompego (nr 4, 5) stwierdzono prawidłowe stężenia hormonów osi tarczycowej oraz ujemne miano przeciwciał przeciwtarczycowych. W USG stwierdzono nieznacznie niejednorodną echogeniczność miąższu tarczycy ze współistnieniem pojedynczych torbieli koloidowych i obecnością węzła chłonnego w cieśni u jednego z pacjentów (nr 5).

U wszystkich pacjentów z chorobą Huntera (nr 6, 7, 8) stwierdzono prawidłowe stężenia hormonów osi tarczycowej i ujemne miano przeciwciał przeciwtarczycowych zarówno w pierwszej jak i drugiej ocenie. Ponadto u wszystkich trzech pacjentów stwierdzono spadek stężenia TSH średnio o 0,4 µIU/ml (od 0,34 do 0,52). W pierwszym badaniu USG u tych pacjentów nie wykazano nieprawidłowości, w drugiej ocenie u dwóch z nich (nr 6, 8) stwierdzono nieznacznie niejednorodną echogeniczność miąższu tarczycy.

Podsumowując, u wszystkich pacjentów (w tym pacjenta z AITD) stwierdzono prawidłowe poziomy TSH, fT3 i fT4. Uwagę zwraca obniżenie poziomu TSH u pacjentów z chorobą Huntera, co może wiązać się zarówno z poprawą funkcji tarczycy, jak i z pogorszeniem funkcji przysadki. Jednocześnie w drugim badaniu USG u dwóch pacjentów z chorobą Huntera zaobserwowano pojawienie się niejednorodnej echogeniczności tarczycy. Z kolei u pacjenta z chorobą Fabry'ego obraz ultrasonograficzny tarczycy uległ normalizacji po 27 miesiącach ERT.

Na podstawie przeglądu piśmiennictwa i wstępnych wyników badań, można stwierdzić, że akumulacja substancji niezmetabolizowanych w rzadkich chorobach spichrzeniowych ma wpływ również na gruczoły dokrewne, w tym na oś przysadka – tarczyca. Stosowanie ERT może mieć działanie protekcyjne przed akumulacją substancji niezmetabolizowanych w gruczole tarczowym i przez to zapobiegać zaburzeniom funkcji i morfologii tego gruczołu; z uwagi na brak penetracji do przysadki, nie chroni przed wtórnymi zaburzeniami czynności tarczycy. Dlatego pacjenci z rzadkimi chorobami spichrzeniowymi powinni być monitorowani w celu rozpoznania ewentualnej pierwotnej lub wtórnej niedoczynności tarczycy zarówno przed, jak i w trakcie ERT.

Wnioski końcowe:

1. Terapia z zastosowaniem przeciwciał przeciwko TNF alfa u pacjentów pediatrycznych z CD ma prewencyjną rolę w rozwoju zaburzeń czynności i morfologii gruczołu tarczowego,

ze szczególnym uwzględnieniem AITD.

2. Badanie ultrasonograficzne gruczołu tarczowego jest wysoce czułym narzędziem w identyfikacji pacjentów z CD, z ryzykiem rozwoju AITD.

3. Akumulacja substancji niezmetabolizowanych w rzadkich chorobach spichrzeniowych niewątpliwie wpływa na gruczoły dokrewne, w tym na oś przysadka – tarczyca. Stosowanie ERT może zapobiegać zaburzeniom funkcji i morfologii gruczołu tarczowego, z uwagi na brak penetracji do przysadki, nie chroni przed wtórnymi zaburzeniami czynności tarczycy. Pacjenci z rzadkimi chorobami spichrzeniowymi powinni być monitorowani w celu rozpoznania ewentualnej pierwotnej lub wtórnej niedoczynności tarczycy zarówno przed, jak i w trakcie ERT.

Streszczenie w języku angielskim:

Introduction:

Biological drugs are one of the greatest innovations in the medicine. Their use allowed to cure diseases that were previously considered incurable or very difficult to treat.

The European Medicines Agency (EMA) defines biological drugs as medicinal products containing one or more active substances that are produced by or derived from an living organism. The Food and Drug Administration (FDA) specifies that biological products include vaccines, blood and blood components, somatic cells, gene therapy, tissues, and recombinant proteins. Classically, taking into account the molecular structure, three groups of biological drugs are distinguished: monoclonal antibodies, fusion proteins and recombinant human cytokines [1].

Biological drugs have become a very important therapeutic option. In recent years, the number of biological drugs available in the treatment have significantly increased. Biological drugs in the form of enzyme replacement therapy have contributed to enormous success in the treatment of rare diseases such as storage diseases.

Biological drugs have significantly improved the prognosis and quality of life. However, therapy with their use is not without the risk of side effects [1, 2]. There is insufficient knowledge about the impact of biological therapy on the functioning of the endocrine system, including the function and morphology of the thyroid gland in children and adolescents.

To quote Pichler, the author of the classification of adverse effects of biological drugs [1]: „The wide use of biological agents in modern medicine is a challenge for doctors, as it is an example of how fast new therapeutical principles based on novel knowledge and modern techniques can enter clinical practice, and that constant learning is required", in this doctoral dissertation, I would like to present the influence of selected biological drugs on the activity and morphology of the thyroid gland. The choice of the subject of the study was dictated by the clinical necessity to understand the topic of possible disturbances in the functioning of the thyroid gland in patients during biological therapy, because it is the most common endocrinopathy in childhood, and thyroid hormones play a key role as a regulator of normal growth, metabolism and myelination of the nervous system [8,9]. Moreover, undiagnosed thyroid gland dysfunction may have a negative impact on the course and treatment of the underlying disease in children and adolescents.

Article 1, 2:

Tumor necrosis factor alfa (TNF-alpha) is an important cytokine of inflammatory and immunological reactions. It is produced mainly by monocytes and macrophages, but its source can also be other cells, including thyroid cells [10, 11]. It is involved in the pathogenesis of many diseases, including autoimmune diseases. This fact has become the basis for the search for new therapeutic options for patients suffering from such diseases including, for example, inflammatory

bowel disease (IBD) [12]. As a consequence, drugs called anti-TNF-alpha were developed, the main task of which is to directly reduce the concentration of TNF-alpha and thus inhibit the cascade of phenomena occurring in the course of its action [13]. TNF-alpha inhibitors are monoclonal antibodies, antibody fragments, or fusion proteins. This group of biological drugs includes, among others, Infliximab (IFX), which is a monoclonal, chimeric, human-mouse (75%: 25% protein structure) IgG1 class antibody [13].

TNF-alpha is also involved in the pathogenesis of thyroid dysfunction, including AITD [14, 15]. As it is known from the literature, very often diseases in which anti-TNF-alpha therapy is used are associated with a higher risk of developing another autoimmune disease, including AITD, compared to the general population. However, it should be emphasized that the current clinical data on the higher incidence of AITD in IBD patients compared to the general population are inconsistent and mainly concern the adult patient population [16-19].

Taking into account the above-mentioned information on the role of TNF-alpha in the etiopathogenesis of thyroid dysfunction, it should be expected that anti-TNF-alpha therapy used due to another disease should have a protective effect against the possible development of autoimmune thyroid disease, and in the case of its presence should show a healing effect. Despite the fact that research on biological drugs anti-TNF-alpha dates back to the 1990s, their results assessing the influence of this therapy on the function or morphology of the thyroid gland apply to the adult population and remain inconclusive [4-6].

Due to the increasing use of anti-TNF-alpha therapy also in the pediatric population - these drugs are used with great effectiveness in the treatment of IBD, we considered it justified to include this group of patients in the research, bearing in mind the key role of euthyroidism in the proper development of children and adolescents.

The diagnosis of AITD is based on the presence of circulating antibodies to thyroid antigens (mainly thyreoperoxidase and thyroglobulin) and the detection of reduced echogenicity of the thyroid gland on ultrasound in a patient with normal or abnormal levels of thyroid hormones [20]. In the opinion of many experts, the ultrasound assessment of the thyroid gland is a more effective tool in the diagnosis and prognosis of AITD than the examination of the presence of circulating antibodies in the blood [21-24].

Undiagnosed thyroid dysfunction may negatively affect the course of CD. In the light of these data, it is crucial to understand the impact of anti-TNF-alpha therapy on the function and morphology of the thyroid gland and to develop methods that will enable early diagnosis of possible disorders.

Article 3:

Storage diseases, genetically determined disorders caused by the deficiency of a specific

enzyme lead to the systemic accumulation of non-metabolized substances. Currently, many of these diseases can be treated causally with enzyme replacement therapy (ERT) [7]. Globally, ERT was first developed for Gaucher disease in the 1990s. The available literature provides some data on the influence of ERT on the dysfunction of many organs and systems. However, the function and morphology of the endocrine glands, including the thyroid gland in storage diseases, and the influence of ERT on their function have not been thoroughly investigated [25-29]. Given the high degree of vascularization and the low proliferation rate of the endocrine glands, they seem prone to the accumulation of non-metabolized substances that may interfere with their function or morphology. This is especially important in the pediatric population, as it is well known that the proper function of the thyroid gland is essential for the proper development of children and adolescents. The clinical picture of storage diseases often includes disorders resulting from neurodegeneration, which could be aggravated by the lack of euthyroidism.

In the light of these data, it seems reasonable to understand the influence of ERT on the function and morphology of the thyroid gland and its expected protective effect on this gland.

Aims of the work:

The first common goal of the series of three studies was to evaluate the effect of biological treatment on the function and morphology of the thyroid gland in children and adolescents. The second, common goal of the series of three studies was the assumption that the obtained results, through early detection of potential disorders and introduction of their appropriate monitoring or treatment, will allow for the proper development of children and adolescents.

Article 1:

The specific aim of ***article 1*** was, based on a review of the literature, to analyze the possible impact of anti-TNF-alpha therapy used in inflammatory and immune diseases on thyroid function and the development of AITD.

Article 2:

The specific aim of ***article 2*** was to evaluate the impact of therapy with Infliximab on the development of dysfunction of the thyroid gland in children and adolescents with CD. In addition, the aim of this study was to evaluate the usefulness of ultrasonography in determining the risk of AITD in pediatric CD patients.

Article 3:

The specific aim of ***article 3*** was to conduct preliminary own research and a review of the literature on the assessment of thyroid function and morphology in pediatric patients treated with enzyme replacement therapy due to storage diseases.

Material and methods:

Article 1:

A literature review based on publications in the PubMed database. The basic criterion was the assessment of the impact of anti-TNF-alpha therapy used in inflammatory and immune diseases on thyroid function and the development of AITD. Ultimately, 10 papers were selected, published in the years 2001 - 2018.

Article 2:

The study included 61 patients with CD, treated at the Department of Paediatrics, Gastroenterology and Nutrition, Department of Paediatrics, Institute of Pediatrics, without any history of thyroid dysfunction. Thirty-six patients were treated with Infliximab (IFX group), while 25 patients (control group) had never received any biological drugs. The Local Ethical Committee approved the study (No. 1072.620.57.2019 of March 28, 2019). Parents and patients over 16 years of age signed an informed consent.1

There were 18 girls (mean age 14.5 ± 2.3 years) and 18 boys (mean age 14.4 ± 4.4 years) in the IFX group. The mean duration of CD in girls was 52.6 ± 31.5 months, the mean duration of IFX therapy was 43.8 ± 30.1 months. The mean duration of CD in boys was 53.6 ± 31.7 months, mean duration of IFX therapy was 34 ± 19.2 months.

In the control group there were 10 girls (mean age 13.9 ± 2.8 years) and 15 boys (mean age 15.2 ± 1.8 years). The mean duration of CD in girls was 26.3 ± 32.5 months, in boys 24.2 ± 22 months.

Thyroid stimulating hormone (TSH), free triiodothyronine (fT3) and thyroxine (fT4) were measured in each patient. In addition, the titers of anti-thyroid peroxidase antibody (ATPO), anti-TSH receptor antibody (TRAb), and anti-thyroglobulin antibody (aTG) were measured in each patient. TSH, fT3, and fT4 levels were measured using direct chemiluminescence assay (Siemens, USA). ATPO, aTG, and TRAb levels were measured using an immunochemical method with isotope label sets (Brahms, Germany).

Each patient had an ultrasound examination of the thyroid gland. The examination included the measurement of both thyroid lobes in three dimensions and the measurement of the thickness of the isthmus of the thyroid gland, evaluation of the echogenicity of the parenchyma and the presence of focal lesions (using both the gray scale and the color Doppler technique).

Statistical analysis was performed using the Dell Statistica 13.1 64-bit package (StatSoft, Kraków, Poland). Variables are presented as mean with SD. Differences between the IFX group and the control group were determined by Student's t-test. For all calculations, statistical significance was assumed at the level of $p < 0.05$.

Article 3:

Eight patients (7 boys, 1 girl) with metabolic diseases treated with ERT and under the constant care of the Department of Paediatrics, Institute of Pediatrics were included in the study.

The Local Ethical Committee approved the study (No. 1072.6120.57.2019 of March 28, 2019). Parents and patients over 16 years of age signed an informed consent.

Three patients with Fabry disease (No. 1 at 17 years old, time from diagnosis 21 months, ERT duration 7 months; No. 2 at 9.9 years old, time from diagnosis 22 months, ERT duration 20 months; No. 3 at 10 years old, time from diagnosis 39 months, duration of ERT 6 months).

Three with Hunter's disease (No. 6 at 12.3 years old, time from diagnosis 148 months, ERT duration 146 months; No. 7 at 4.1 years old, time from diagnosis 46 months, ERT duration 43 months; No. 8 at 9.3 years old, time from diagnosis 84 months, ERT duration 79 months).

Two with Pompe disease (No. 4 at 6.8 years old, time from diagnosis 84 months, ERT duration 81 months; No. 5 at 9.5 years old, time from diagnosis 26 months, ERT duration 25 months).

Seven of those patients had no history of thyroid gland dysfunction, one patient (No. 2) had a diagnosis of AITD (4 years prior to Fabry disease).

Thyroid stimulating hormone (TSH), free triiodothyronine (fT3), and thyroxine (fT4) were measured in each patient during ERT. In addition, the titers of anti-thyroid peroxidase antibody (ATPO), anti-TSH receptor antibody (TRAb), and anti-thyroglobulin antibody (aTG) were measured in each patient. TSH, fT3, and fT4 levels were measured using direct chemiluminescence assay (Siemens, USA). ATPO, aTG, and TRAb levels were measured using an immunochemical method with isotope label sets (Brahms, Germany).

Each patient had an ultrasound examination of the thyroid gland. The examination included the measurement of both thyroid lobes in three dimensions and the measurement of the thickness of the isthmus of the thyroid gland, evaluation of the echogenicity of the parenchyma and the presence of focal lesions (using both the gray scale and the color Doppler technique).

In addition, three patients with Hunter's disease (No. 6-8) and one with Fabry disease (No. 1) underwent reassessment of thyroid function parameters (TSH, fT3, fT4), antibody titers (ATPO, aTG, TRAb), and the ultrasound of the thyroid gland (patient no. 7 was not reassessed) after 27 months of ERT.

Statistical analysis was performed using Dell Statistica 13.1 64-bit package (StatSoft, Krakow, Poland). Variables were presented as the mean of SD.

Results:

<u>Article 1:</u>

Anti-tumour necrosis factor α therapy – Does it increase the risk of thyroid disease or protect against its development?

(Pediatric Endocrinology Diabetes and Metabolism. 2020;26(3):144-149).

Although research on biological anti-TNF-alpha drugs dates back to the 1990s, according to the cited reports, despite the relatively long observation period, the question of the impact of anti-TNF-alpha therapy, used in other inflammatory and immune diseases, on the thyroid function and development of AITD, still remains open. There are few reports on this subject, they provide very varied data and mainly concern the adult patient population. Due to the increasing frequency of using anti-TNF-alpha therapy also in the pediatric population, it seems justified to conduct studies to assess the thyroid function and the development of AITD also in this group of patients.

Summing up, the conclusions of this work became an introduction to the research and the next publication, which is part of this doctoral dissertation, on the impact of anti-TNF-alpha therapy on the function and morphology of the thyroid gland in children and adolescents with CD.

Article 2:

Infliximab Therapy Could Decrease the Risk of the Development of Thyroid Disorders in Pediatric Patients With Crohn's Disease.

(Frontiers in Endocrinology. 2020;11)

In the IFX group, 6/36 patients (5/18 girls, 1/18 boys) had abnormal echogenicity of the thyroid parenchyma on ultrasound (three patients showed heterogeneous echogenicity, two patients slightly decreased echogenicity, and one significantly decreased echogenicity). The mean duration of CD in these patients was 46 ± 20.31 SD months (range 21–72 months). The mean duration of IFX therapy was 41 ± 17.9 SD months (range 21–59 months). In 8/36 patients, small colloid cysts located in the lower poles of the thyroid glands were found, and in one boy, two cystic solid lesions in both thyroid lobes (in left lobe 4.5 × 4.3 × 2.1mm; in the right lobe 6.2 × 7.3 × 3.2mm) were present (in a repeated examination after 6 months, their dimensions were reduced and their cystic nature was confirmed). In the IFX group, 25/36 patients had normal thyroid parenchyma on ultrasound.

In the control group, 11/25 patients (5/10 girls, 6/15 boys) had abnormal echogenicity of the thyroid parenchyma on ultrasound (four patients showed heterogeneous parenchymal echo pattern, seven, heterogeneous and significantly hypoechoic parenchymal echo pattern). The mean disease duration in these patients was 28.7 ± 26.1 SD months (range 3–72 months). In 9/25 children, small colloid cysts localized in the lower poles of both lobes of the thyroid glands were present. Other patients of the control group (13/25) had a normal ultrasound pattern of thyroid gland.

The parameters assessing thyroid function (TSH, fT3 and fT4) remained within the normal range in both groups. However, TSH levels were not statistically significantly lower in the IFX group (1.31 ± 0.75 μIU/ml) compared to the control group (1.68 ± 0.79 μIU/ml) ($p = 0.69$). In contrast, fT4 levels were statistically significantly higher in the control group (17.17 ± 2.46 pmol/l)

compared to the IFX group (13.96 ± 1.95 pmol/l) ($p < 0.001$). There were no differences in fT3 levels between the two groups.

Antibody titers (ATPO, aTG, TRAb) remained negative in both groups. Patients from the IFX group had a statistically significantly lower titer of TRAb antibodies compared to the control group (0.53 ± 0.19 IU/ml vs 0.69 ± 0.22 IU/ml; $p = 0.03$).

Moreover, in patients from control group with heterogeneous / hypoechoic thyroid parenchyma on ultrasound examination, higher TRAb titers were found compared to patients with normal thyroid image on ultrasound examination (0.79 ± 0.23 IU/ml vs 0.59 ± 0.17 IU/ml; $p = 0.042$).

In summary, there was a 10-fold higher incidence of significant reductions in thyroid parenchymal echogenicity in patients not receiving biological treatment (7/25 patients, 28%) compared to patients receiving IFX (1/36, 2.8%). Moreover, a lower TSH concentration and a TRAb antibody titer were found in the IFX group compared to the control group.

The above data clearly suggest a preventive role of IFX in the likely development of AITD in patients with CD. Moreover, the results indicate high usefulness of thyroid ultrasound examination as a tool in identifying patients with CD at risk of developing AITD.

Article 3:

Assessment of the thyroid gland's function and morphology in paediatric patients treated with enzyme replacement therapy due to storage diseases - preliminary results of own research and the review of the literature.

(Pediatric Endocrinology Diabetes and Metabolism – article accepted for publication)

Among patients with Fabry disease, patient No. 1 had normal thyroid hormone levels (with a decrease in TSH concentration from 2.8 to 2.36 μIU / ml, no significant differences in fT3 and fT4) and negative titer of anti-thyroid antibodies in the first and second assessment; the ultrasound showed a clear improvement (in the first assessment, slightly heterogeneous echogenicity with the coexistence of colloid cysts, in the second assessment, the echogenicity of the thyroid gland was normal). Patient No. 2, treated for hypothyroidism in the course of AITD diagnosed 4 years before the diagnosis of Fabry disease, had normal thyroid hormone results (during L-thyroxine substitution, 50 μg per day), positive titer of anti-thyroid antibodies and typical AITD ultrasound image of the thyroid gland, however, according to the data, it was necessary to reduce the substitution dose of L-thyroxine (from 62.5 μg to 50 μg per day). Patient No. 3 had normal thyroid hormone results, negative titer of anti-thyroid antibodies and normal ultrasound of the thyroid gland.

All patients with Pompe disease (No. 4, 5) had normal levels of thyroid axis hormones and negative titres of anti-thyroid antibodies. Ultrasound revealed a slightly heterogeneous echogenicity

of the thyroid parenchyma with the coexistence of single colloid cysts and the presence of a lymph node in the isthmus in one of the patients (No. 5).

All patients with Hunter's disease (No. 6, 7, 8) had normal thyroid axis hormone levels and negative antithyroid antibodies in both the first and second assessments. Moreover, in all three patients a decrease in TSH concentration was found on average by 0.4 μIU / ml (from 0.34 to 0.52). The first ultrasound examination in these patients showed no abnormalities, in the second assessment, two of them (No. 6, 8) showed a slightly heterogeneous echogenicity of the thyroid parenchyma.

In conclusion, all patients (including the patient with AITD) had normal levels of TSH, fT3 and fT4. Attention is drawn to the reduction in TSH levels in patients with Hunter's disease, which may be associated with both the improvement of thyroid function and the deterioration of the pituitary gland function. At the same time, in the second ultrasound examination, heterogeneous echogenicity of the thyroid gland was observed in two patients with Hunter's disease. In a patient with Fabry disease, the ultrasound image of the thyroid gland normalized after 27 months of ERT.

Based on a review of the literature and preliminary research results, it can be concluded that the accumulation of non-metabolized substances in rare storage diseases also affects the endocrine glands, including the pituitary-thyroid axis. The use of ERT may have a protective effect against the accumulation of non-metabolized substances in the thyroid gland and thus prevent disturbances in the function and morphology of this gland; due to the lack of penetration into the pituitary gland, it does not protect against secondary disorders of the thyroid gland. Therefore, patients with rare storage diseases should be monitored for diagnosis of possible primary or secondary hypothyroidism both before and during ERT.

Final conclusions:

1. Therapy with anti-TNF alpha antibodies in pediatric patients with CD has a preventive role in the development of dysfunction of the thyroid gland, with particular emphasis on AITD.
2. Ultrasound examination of the thyroid gland is a highly sensitive tool in identifying CD patients at risk of developing AITD.
3. The accumulation of non-metabolized substances in rare storage diseases undoubtedly affects the endocrine glands, including the pituitary-thyroid axis. The use of ERT can prevent disturbances in the function and morphology of the thyroid gland, but due to the lack of penetration into the pituitary gland, it does not protect against secondary disturbances of the thyroid gland. Patients with rare storage diseases should be monitored for diagnosis of possible primary or secondary hypothyroidism both before and during ERT.