

## Streszczenie języku polskim

Wstęp: W ostatnich latach obserwuje się rosnący trend zachorowań na schorzenia o podłożu autoimmunologicznym. Autoimmunizacyjne choroby tarczycy (ATD) na czele z przewlekłym zapaleniem tarczycy typu Hashimoto (HT) oraz chorobą Gravesa- Basedowa (GD) stanowią istotny problem terapeutyczny w pediatrycznej grupie pacjentów. Wciąż aktualny jest pogląd, że patogenezą ATD opiera się na obecności triady czynników spustowych, jakimi są: predyspozycje genetyczne, czynniki środowiskowe oraz dysfunkcja immunologiczna. Mimo tej wiedzy, badacze nieustannie eksplorują tę tematykę w celu znalezienia nowych metod prewencji oraz terapii ATD.

Celem pracy doktorskiej była:

1. Ocena odsetka komórek B regulatorowych o fenotypie CD19+CD24<sup>hi</sup>CD27+IL-10<sup>+</sup> oraz CD19+IL-10<sup>+</sup> (B10) u dzieci z autoimmunizacyjnymi schorzeniami tarczycy (ATD) w porównaniu do grupy kontrolnej.
2. Ocena wpływu zastosowania leczenia tyreostatykiem (w przypadku nadczynności tarczycy) oraz lewotyroksyną (w przypadku niedoczynności tarczycy) na odsetek komórek Breg.
3. Ocena korelacji wymienionych wyżej subpopulacji komórek Breg ze stężeniem hormonów i przeciwciał przeciw-tarczycowych.
4. Ocena ekspresji ZnT8 w tkance tarczycowej u pacjentów po tyreoidektomii z powodu choroby Gravesa-Basedowa (GD).

Pacjenci: Do badania zakwalifikowano dzieci i młodzież w wieku 5-19 lat będących pod opieką Kliniki Pediatrii, Endokrynologii, Diabetologii z Pododdziałem Kardiologii oraz Poradni Endokrynologicznej UDSK w Białymstoku. Pierwszą grupę badaną stanowiło 53 pacjentów pediatrycznych ze zdiagnozowaną chorobą autoimmunologiczną tarczycy (12 pacjentów z chorobą Gravesa- Basedowa oraz 10 z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto). Kontrolę stanowiło 15 pacjentów bez żadnych chorób o podłożu autoimmunologicznym, zapalnym i nowotworowym. Wszyscy badani mieli pobrane standardowe analizy laboratoryjne oceniające funkcję tarczycy oraz włączoną typową farmakoterapię- tiamazol w przypadku GD oraz lewotyroksynę w HT. Ocenę Breg przy pomocy cytometrii przepływowej wykonywano w trzech punktach czasowych: przy przyjęciu, po 3 i po 12 miesiącach terapii.

W przypadku oceny ekspresji ZnT8 grupę badaną stanowili pacjenci w wieku 8- 18 lat: 17 z wolem guzkowym nietoksycznym tarczycy (NTNG) oraz 20 pacjentów z chorobą Gravesa- Basedowa. Pacjenci poddani byli całkowitej lub subtotalnej tyreoidektomii.

Trzecią i zarazem ostatnią grupę badaną stanowili pacjenci z chorobą Gravesa-Basedowa (n=22) poddawani leczeniu tiamazolem w dawce początkowej 0.5-1.0 mg/kg/ masy ciała/dobę. Wspomniani pacjenci byli obserwowani przed rozpoczęciem terapii oraz trakcie jej trwania: 3 miesiące oraz 1 rok. Dodatkowo, zebrano również grupę kontrolną (n=31) składającą się z pacjentów pediatrycznych bez chorób autoimmunologicznych i zapalnych, z ujemnym wywiadem rodzinnym w tym kierunku.

Metody: ocenę częstości występowania poszczególnych populacji limfocytów B regulatorowych u pacjentów pediatrycznych z ATD po inkubacji z odpowiednimi stymulantami, poddanej procedurze barwienia receptorów zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych połączonych z odpowiednimi fluorochromami przeprowadzono metodą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem cytometru BD FACS Calibur (BD Bioscience) oraz oprogramowania FlowJo (Tree Star Inc.).

Ekspresję ZnT8 w ludzkich tkankach tarczycy uzyskanych po zabiegach operacyjnych od pacjentów z chorobami tarczycy o podłożu immunologicznym i nieimmunologicznym wykonano w oparciu o analizy immunohistochemiczne, Western Blot oraz immunofluorescencję.

Uzyskane wyniki: wykazały zmniejszoną liczbę komórek B produkujących IL-10 (B10) zarówno w stosunku do limfocytów B, jak i wszystkich limfocytów w każdej badanej grupie, w porównaniu do zdrowej kontroli. Odnotowano spadek produkcji IL-10 przez limfocyty Breg wykazujące się ekspresją CD19+CD24+CD27+IL-10 i CD1d+CD5+CD19+IL-10+ zarówno w nieleczonej i leczonej grupie pacjentów z ATD.

W badanej grupie pacjentów odnotowano wyższe poziomy FcγR3+ i IL-10+ Breg z fenotypem CD38(-) i zmniejszoną liczbę CD38+FcγR3+IL-10+ u dzieci z GD. Ponadto stwierdzono, że wybrane podgrupy Breg istotnie korelują z poziomami TSH i TRAb.

Stwierdzono znacznie wyższe poziomy komórek efektorowych Th1, Th17 i Th22 u pacjentów z chorobą Gravesa- Basedowa. Tiamazol nie wpływał istotnie na zmiany w obrębie badanych komórek, z tendencją jedynie do redukcji limfocytów Th22 po 1 roku terapii. W przeciwieństwie do zdrowych osób z grupy kontrolnej, pacjenci z GD wykazali istotne korelacje między badanymi limfocytami Th i Breg tylko w kontekście limfocytów Th1 i Th17. Wdrożenie leczenia tiamazolem wywołało niewielkie, ale statystycznie nieistotne zmiany w tych wzajemnych interakcjach.

Ekspresję transportera ZnT8 zidentyfikowano metodą immunohistochemiczną w tkankach tarczycy u pacjentów pediatrycznych z GD w stopniu (+++) i NTNG (++) . Ekspresję tę stwierdzono zarówno w komórkach pęcherzykowych tarczycy (w cytoplazmie i błonie cytoplazmatycznej w komórkach pęcherzykowych), jak i komórkach C (reakcja błonowo-cytoplazmatyczna) metodą immunohistochemiczną i immunofluorescencji.

Na podstawie przeprowadzonych badań wysunięto następujące wnioski:

1. Przeprowadzone badania pozwoliły na wskazanie nowych aspektów patogenetycznych prowadzących do rozwoju chorób autoimmunizacyjnych tarczycy u dzieci.
2. Redukcja odsetka limfocytów Breg z fenotypem CD19+CD24+CD27+IL-10+ i CD19+IL-10 odpowiada za zaburzenia tolerancji immunologicznej w przebiegu choroby GD u dzieci. Analiza udziału Breg w przebiegu ATD powinna być skupiona na efektach wywoływanych przez te komórki, a nie na obecności ich konkretnych fenotypów.
3. Obecność ekspresji ZnT8 w tkance tarczycowej pacjentów z GD i NTNG sugeruje potencjalną rolę tego transportera jako kolejnego autoantygeny w patogenezie ATD.
4. Uzyskane wyniki mogą stanowić fundament do dalszych badań nad komórkami immunokompetentnym i autoantygenami oraz wykorzystania ich potencjału w nowych metodach terapii chorób autoimmunizacyjnych.