

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ - СКОПЈЕ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
ЈЗУ УНИВЕРЗИТЕТСКА КЛИНИКА ЗА ДЕТСКИ БОЛЕСТИ СКОПЈЕ



Асс.д-р Николина Здравеска

---

**КОНГЕНИТАЛЕН ХИПОТИРОИДИЗАМ ОТКРИЕН НА  
НЕОНАТАЛЕН СКРИНИНГ ДО ДЕФИНИТИВНА ДИЈАГНОЗА  
И ПРОЦЕНКА ОД ПОТРЕБАТА ЗА ТРАЈНА ТЕРАПИЈА**

- докторска дисертација -

Ментор: Проф.д-р Мирјана Кочова

Скопје, јуни 2018 година

## БЛАГОДАРНОСТ

На мојот ментор, *проф.д-р Мирјана Кочова*

За укажаната доверба и целокупната поддршка во изработката на докторскиот труд, за пренесеното знаење во стручната и научно-истражувачката работа, за целата наша соработка, за сите заеднички научни трудови, за сите совети, пофалби, но и добронамерни критики кои несомнено имаа огромен придонес во мојата научна надградба.

**Чест е да ја имате проф.Кочова за ментор.**

На *проф.д-р Катица Пиперкова*, мојот учител и раководител

За целокупното пренесено стручно знаење, за пренесената љубов кон неонатологијата уште од самиот мој почеток како млад лекар-волонтер и специјализант. Вашето непроценливо клиничко искуство, вашите совети, кои ќе ги паметам цел живот претставуваат мој водич и стимул за понатамошна надградба како педијатар-неонатолог.

На членовите на рецензентската комисија: *проф.д-р Оливија Васкова, проф.д-р Елизабета Зисовска и науч.сор. Виолета Анастасовска* за искрената поддршка и соработка, како и за позитивната оценка на мојата работа.

Изразувам благодарност на *стручниот колегиум на Институтот за патофизиологија и нуклеарна медицина* за успешната соработка во реализирањето на тироидните скенови и за сите за стручни сугестии и дискусии.

Посебна благодарност изразувам на *Dr.Nadia Schoenmakers* и *Dr.Adeline K Nicholas* од Универзитетот во Кембриџ, Велика Британија (University of Cambridge, Metabolic Research Laboratories, Wellcome Trust MRC, Addenbrooke's Hospital) за воспоставената соработка, за изведувањето на молекуларните анализи, за сите сугестии, кои на овој докторски труд му дадоа посебна вредност, но и поттик за понатамошна научна соработка.

Благодарам на моите соработници, особено на персоналот од *одделите за неонатологија и ендокринологија при Универзитетската Клиника за детски болести* за секојдневната посветеност во работата и гржата за нашите, најмали и најмили пациенти

Благодарам на моето семејство, мојата неуморна мотивација, за поддршката, разбирањето и трпението во целиот процес на реализацијата на докторската дисертација.

*На моите родители,*  
**за неизмерната љубов и поддршка низ годините**

*На мојот син Алек,*  
**моето најголемо животно достигнување,  
мојот синоним за совршенство**

---

## СОДРЖИНА

---

РЕЗИМЕ .....	4
ABSTRACT .....	7
Листа на употребувани кратенки .....	10
1. ВОВЕД	
1.1 Онтогенеза на тироидната функција кај фетусот и новороденчето.....	12
1.1.1 Ембрионален развој на тироидната жлезда .....	12
1.1.2 Хипоталамично-хипофизна оска .....	15
1.1.3 Механизми на дејствување на тироидните хормони .....	17
1.1.4 Матурација на периферниот метаболизам на тироидните хормони.....	18
1.2 Улога на плацентата .....	19
1.2.1 Плацентарен трансфер на јод, тироксин и имуноглобулини .....	19
1.3 Тироидна функција во неонатална возраст .....	21
1.3.1 Прематурни новороденчиња .....	22
1.3.2 Новородени мали за гестациска старост .....	23
1.4 Конгенитален хипотироидизам.....	25
1.4.1 Дефиниција и класификација.....	25
1.4.2 Етиологија и патогенеза .....	26
1.5 Тироидна дизгенеза .....	27
1.5.1 Генетика на тироидните дизгенези .....	28
1.5.2 Моногенетски форми на тироидни дизгенези .....	29
1.6 Тироидна дисхормоногенеза .....	33
1.6.1 Генетика на тироидните дисхормоногенези .....	34
1.7 Неонатален скрининг .....	39
1.7.1 Евалуација на новороденче со позитивен неонатален скрининг .....	40
1.7.2 Имицинг иследувања .....	41
1.8 Терапија и следење .....	43
1.9 Дијагностичка ре-евалуација и прекин на терапијата .....	44

---

2. МОТИВ .....	45
3. ЦЕЛИ НА ТРУДОТ .....	46
4. ХИПОТЕЗИ .....	46
5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ	
5.1 Пациенти .....	46
5.1.1 Критериуми за вклучување во студијата .....	48
5.1.2 Критериуми за исклучување од студијата .....	48
5.2 Дизајн на студијата .....	48
5.2.1 Класификација во групи .....	49
5.3 Лабораториски методи .....	50
5.4 Имиџинг иледувања .....	50
5.4.1 Тироидна ултрасонографија .....	50
5.4.2 Тироидна сцинтиграфија .....	51
5.5 Генетски анализи .....	52
5.6 Анализа на податоци .....	54
6. СТАТИСТИЧКА ОБРАБОТКА НА ПОДАТОЦИТЕ .....	56
7. РЕЗУЛТАТИ .....	59
7.1 Компарација на испитуваните параметри помеѓу пациентите со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам.....	64
7.1.1 Споредба на вредностите на TSH на неонатален скрининг и серумскиот TSH меѓу пациентите со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам .....	65
7.1.2 Споредба на вредностите на серумскиот тотален тироксин меѓу пациентите со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам .....	68
7.1.3 Споредба на иницијалната доза на левотироксин помеѓу пациентите со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам .....	70
7.1.4 Споредба на вредноста на TSH по 1 месец од отпочнувањето со терапија меѓу пациентите со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам .....	71
7.1.5 Споредба на дозата на левотироксин во 1-вата, 2-рата и 3-тата година меѓу пациентите со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам.....	72

---

7.2	Анализа на испитуваните параметри при дијагностичката ре-евалуацијата .....	74
7.2.1	Споредба на нивоата на серумски TSH при поставување на дијагноза и при ре-евалуација кај пациентите со перманентен хипотироидизам .....	76
7.2.2	Споредба на нивоата на серумски TSH и T4 при дијагнозата на КХ и при ре-евалуацијата кај пациентите со транзитoren хипотироидизам .....	78
7.2.3	Споредба на нивоата на серумски TSH при дијагнозата на КХ и при ре-евалуацијата кај пациентите со субклинички хипотироидизам .....	79
7.2.4	Анализа на тироидниот скен при ре-евалуација.....	81
7.2.5	Тироидна ултрасонографија во склоп на дијагностичката ре-евалуација кај пациентите со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам .....	83
7.2.6	Споредба помеѓу иницијалниот ултразвучен наод и ултразвучниот наод при ре-евалуацијата кај пациентите со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам .....	85
7.3	Споредба на анализираните параметри меѓу различните етиолошки типови на хипотироидизам – тироидни дизгенези и тироидни дисхормоногенези.....	88
7.4	Корелации помеѓу анализираните варијабли.....	97
7.5	Бинарна логистичка регресија за детерминација на сигнификантни предиктори за развој на транзитoren хипотироидизам .....	106
7.6	Cutoff вредности .....	108
7.7	Резултати од генетски анализи .....	114
8.	ДИСКУСИЈА .....	124
9.	ЗАКЛУЧОЦИ .....	151
10.	ЛИТЕРАТУРА .....	154
11.	ПРИЛОГ – Објавени трудови во меѓународни списанија со импакт фактор .....	173

## **РЕЗИМЕ**

**Вовед:** Конгениталниот хипотироидизам кој по дефиниција претставува дефицит на тироидни хормони на раѓање е најчестото неонатално ендокринолошко заболување. Тироидните хормони имаат клучна улога во процесите на невронска миграција и диференцијација, миелинизација, синаптогенеза и се неопходни за адекватен невроразвој. Поради тоа раната детекција на КХ и отпочнување со терапија, со цел постигање на еутиреотична состојба колку што е можно порано е неопходна за оптимален развој кај сите деца со КХ. КХ е класифициран во две големи групи како перманентен и транзитoren хипотироидизам, во зависност од потребата за трајно спроведување на левотироксинска терапија. Најголем број од децата со КХ имаат перманентен хипотироидизам предизвикан од пореметувања на тироидната морфоенеза, или означени како тироидни дизгенези, или пак како резултат на автосомно рецесивни дефекти во ситнезата на тироидните хормони, означени како тироидни дисхормоногенези. Генетски варијации во најмалку 15 гени се асоцирани со појавата на КХ. Етиологијата на КХ е важна за одредување на тежината на хипотироидизмот и неговата прогноза, а со тоа адекватно клиничкото водење како и проценка од потребата за генетско советување. Голем број од студии, од различни региони во светот во изминативе години укажуваат на зголемената инциденца на КХ од 1:1500 новороденчиња, со особено зголемување на инциденцата на умерените форми со еутопична тироидна жледа, кои понатаму можат да преминат во транзитoren хипотироидизам. За разграничување помеѓу транзиторните и перманентни форми на КХ водичите издадени од релевантните здруженија за КХ препорачуваат дијагностичка ре-евалуација со тест со краткотрајно прекинување на терапијата на возраст по 3 години, кај сите деца со непозната етиологија на КХ.

**Цел:** Нашата студија претставува прва дијагностичка ре-евалуација на пациентите со КХ дијагностицирани преку националната скрининг програма, со тест со прекин на терапијата. Целите ни беа поставување на етиолошката дијагноза на КХ, утврдување на преваленцата на транзитoren хипотироидизам помеѓу пациентите со КХ, и детерминирање на предиктивни фактори кои би можеле да послужат за разграничување на

перманентните и транзиторни форми на КХ. Освен тоа, со изведувањето на генетските анализи имавме цел да се направи молекуларна карактеризација на пациентите со КХ со еутопична тироидна жлезда.

**Материјал и методи:** Во студијата беа вклучени 127 деца со конгенитален хипотироидизам откриени на неонатален скрининг од неговото воведување во Р.Македонија во април 2002 год. до декември 2015 година, кои редовно се следат во консултативната ендокринолошка амбуланта на Клиника за детски болести. Кај децата со КХ постари од 3 години беше направен тест со прекин на левотироксинската терапијата во период од 30 дена. Ре-евалуацијата опфаќаше анализа на тироидната функција (одредување на вредностите на TSH, T4/fT4) и имиџинг иследувања (тироидна ултрасонографија и тироидна сцинтиграфија). Според резултатите од тестовите за тироидната функција пациентите беа класифицирани во три групи: **перманентен хипотироидизам** (TSH >10 mIU/l), **транзиторен хипотироидизам**; (TSH < 5 mIU/l) при ре-евалуацијата и после најмалку 6 месеци период на следење, и **умерена хипертиреотропинемија или субклинички хипотироидизам**; дефиниран со умерена елевација на TSH (5-10 mIU/l). Понатамошна етиолошка класификација беше направена врз основа на ултрасонографските, сцинтиграфските и молекуларните наоди. Мултигенетско секвенционирање на кандидатските гени асоцирани со КХ: *TG*, *TPO*, *DUOX2*, *DUOXA2*, *SLC5A5*, *SLC26A4*, *IYD* и *TSHR* беше направено кај 22 пациенти со КХ со еутопична тироидна жлезда, и тоа фамилијарни и спорадични случаи асоцирани со перманентен, транзиторен или субклинички фенотип на хипотироидизмот.

**Резултати:** Перманентниот хипотироидизам беше доминантен тип на хипотироидизам, застапен во 48,4%, додека транзиторниот хипотироидизам беше присутен кај 30,5% случаи, а 21,1% од пациентите имаа субклинички хипотироидизам. Перманентниот хипотироидизам во 86% беше резултат на пореметувања на тироидната морфогенеза (атиреози 53%, ектопии 30%, тироидни хипоплазии 17%), а во 14% како резултат на пореметување на тироидната дисхормоногенеза. Пациентите со транзиторен и субклинички хипотироидизам имаа сигнификантно пониски иницијални вредности на TSH и повисоки вредности на T4 во споредба со пациентите со перманентен

хипотироидизам ( $p < 0,001$ ), како и пониски терапевски потреби од левотирокин во тек на следењето. Иницијална вредност на TSH  $< 31,05$  mIU/L, со сензитивност од 93,6% и специфичност од 80,9% , како и доза на левотироксин на возраст од 3 години од  $2,54 \mu\text{g}/\text{kg}$ , со 91,3% сензитивност и 86,7% специфичност беа детерминирани како сигнификантни предиктивни фактори за дијагноза на транзиторен хипотироидизам.

Кај 27% од пациентите беа идентификувани мутации и тоа: c.1187\_1188insGCCG мутација во *TPO* генот во хетерозиготна форма кај две сестрички со тежок хипотироидизам, две мутации во *TPO* во хетерозиготна форма c.31\_50dup/ c.1313G>A (compound хетерозигот) кај дете со тежок хипотироидизам и пренатално дијагностицирана гушавост, две нови мутации во *TSHR* генот (c.1516G>A и c.692+1\_692+4delGTGA) кај деца со субклинички хипотироидизам и c.4637A>G мутација во *DUOX2* во еден случај со транзиторен хипотироидизам.

**Заклучок:** Значителен дел од пациентите дијагностицирани со КХ имаат транзиторен хипотироидизам. Иницијалната вредност на TSH и дневната терапевска доза на левотироксин во тек на следењето имаат предиктивна улога во дискриминацијата помеѓу транзиторниот и перманентниот хипотироидизам. Дијагностичната ре-евалуација е особено значајна за откривање на случаите со транзиторен хипотироидизам, а со тоа и избегнување на непотребното спроведување на терапија. Кај одредени пациенти со КХ, кои во тек на следењето одржуваат еутиреотична состојба со ниски дози на левотироксин, ре-евалуацијата може да се направи и порано, односно на возраст помеѓу 2 и 3 години. Потребно е проширување на генетските студии кај поголем број пациенти со КХ, вклучително и студии со whole exome sequencing се со цел молекуларно разјаснување на етиологијата на КХ со еутопична жлезда, која е исклучително комплексна и сеуште неразјаснета во глобални рамки.

**Клучни зборови:** конгенитален хипотироидизам, етиологија, перманентен, транзиторен, субклинички, левотироксин

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Congenital hypothyroidism (CH), defined as lack of thyroid hormones at birth, is the most common neonatal endocrine disorder. Thyroid hormones play important role in the processes of neuronal migration and differentiation, myelination and synaptogenesis and are essential for proper neurodevelopment. Thus, early detection and prompt treatment in order to achieve euthyroid state as soon as possible is necessary for optimal outcome in all children with CH. CH is generally classified into two main groups: permanent CH and transient CH depending on the lifelong therapy requirements. The vast majority of CH children will have permanent hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis due to abnormal thyroid development or thyroid dyshormonogenesis due to autosomal recessive defect of thyroid hormone biosynthesis. Genetic variations in at least 15 different genes have been associated with CH. The etiology of CH is important for determining the severity of the disease and its prognosis, clinical management and the need for genetic counseling. A number of recent studies worldwide have reported a change in the epidemiology of CH with a doubling incidence of 1 in 1500 live newborns, mostly caused by the increasing number of the mild and potentially transient CH cases with eutopic thyroid gland.

To distinguish between transient and permanent forms, the guidelines recommend re-evaluation after 3 years of age in all children with unexplained CH through a trial of treatment withdrawal. This is important since some cases of transient CH induced by identifiable or non-identifiable factors may require only a short-term therapy.

**Aim:** Our study is a first thyroxine therapy withdrawal study for diagnostic re-evaluation in Macedonian CH patients diagnosed through the national screening programme. We aimed to evaluate the etiology of CH, to estimate the prevalence of transient CH and identify predictive factors for distinguishing between permanent (PCH) and transient CH (TCH). Also, we aimed to characterize molecularly our patients with CH with eutopic thyroid gland.

**Material and methods:** A total of 127 CH patients diagnosed through newborn screening in the period from April 2002 to December 2015 were included in the study. Patients with CH aged >3 years underwent a trial of treatment withdrawal for 30 days period. Thyroid function testing

(TSH, T4/fT4 determination), ultrasound and Technetium-99m pertechnetate thyroid scan were performed thereafter. TCH was defined if TSH<5mIU/L and remained within normal limits for at least 6-month follow-up. PCH was diagnosed when TSH was >10mIU/L, thus therapy was reintroduced and patients were classified according the imaging findings. When the TSH values were between 5-10mIU/L at re-evaluation and after that during the follow-up, patients were classified as persistent hyperthyrotropinemia or subclinical hypothyroidism, thus low dose of levothyroxine therapy was reintroduced. A multigenic sequencing of CH candidate genes including *TG*, *TPO*, *DUOX2*, *DUOXA2*, *SLC5A5*, *SLC26A4*, *IYD* and *TSHR* was performed in a cohort of 22 CH patients with “gland in situ”, both familial and sporadic cases, associated with permanent, transient or subclinical phenotype.

**Results:** Permanent hypothyroidism was the dominant form of hypothyroidism in 48,4% of the patients. 30 % patients had transient hypothyroidism and 21,1% of the patients had subclinical hypothyroidism. Thyroid agenesis was the most prevalent (53%) form in the PCH group, followed by thyroid ectopia in 30%, and thyroid hypoplasia in 17% of the cases. Thyroid dysmorphogenesis was an etiology of permanent hypothyroidism in 14%. Patients with TCH had lower initial TSH values ( $P < 0.0001$ ); higher serum T4 levels, as well as lower mean doses of levothyroxine during treatment period ( $P < 0.0001$ ) than patients with PCH. Initial TSH level <31.05 IU/mL, sensitivity 93.6% and 80,9% specificity, and levothyroxine dose at 3 years of age <2.54 mg/kg/day; sensitivity 91.3%, specificity 86.7% were significant predictive factors for TCH.

Mutations were identified in 27% of patients in the *TPO*, *TSHR* and *DUOX2* genes. In two siblings with severe persistent CH, monoallelic c.1187\_1188insGCCG mutation in *TPO* gene was detected. A child with prenatally diagnosed goiter was compound heterozygous for two mutations in *TPO* gene (c.31\_50dup/ c.1313G>A). Two novel mutations were detected in *TSHR* gene in children with subclinical hypothyroidism c.1516G>A and c.692+1\_692+4delGTGA. A previously known mutation c.4637A>G in the *DUOX2* gene was detected in heterozygous state in one child with transient hypothyroidism.

**Conclusion:** Transient hypothyroidism presents a significant portion of patients with CH. Initial TSH value and levothyroxine dose during treatment period has a predictive role in differentiating TCH from PCH. Diagnostic re-evaluation through a trial off therapy is an effective method for detecting the transient cases and avoiding overtreatment. Earlier re-evaluation, particularly between 2 and 3 years age might be considered in some patients requiring low doses of levothyroxine. Genetic variants were not frequently found in Macedonian CH patients, thus the etiology of CH with eutopic, “gland in situ” remains elusive. Factors other than known dysmorphogenesis-associated genes or the *TSHR* have to be considered, as well as future studies with larger number of patients, but also studies with whole exome sequencing in negative cases for elucidating the cause of hypothyroidism.

**Keywords:** congenital hypothyroidism, etiology, permanent, transient, subclinical, levothyroxine

---

## ЛИСТА НА УПОТРЕБУВАНИ КРАТЕНКИ

---

АД – автосомно доминантно  
AUC – area under curve (површина под кривата)  
АР- автосомно рецесивно  
ГН – гестациска недела  
Д2 - дејодиназа тип 2  
Д3 – дејодиназа тип 3  
DUOX2 - Дуал Оксидаза 2  
DUOXA2 - Дуал оксидаза матурационен фактор 2  
ДЈТ - ди-јодтирозин  
DNA – деоксирибонуклеинска киселина  
ESPE - Европското Здружение за Педијатриска Ендокринологија  
IYD – јодотирозин дејодиназа  
IQR – интерквартален ранг  
КХ – конгенитален хипотироидизам  
LT4 - левотироксин  
MAF – minor allele frequency  
MBq- мегабекерел  
µg/dL – микрограми/децилитар  
µg/kg – микрограми / килограм телесна тежина  
mIU/L – мили интернационални единици / литар  
МЈТ - моно-јодтирозин  
µL- микролитар  
NIS - натриум-јод симпортер  
neoTSH- TSH на неонатален скрининг  
ng/dL – нанограми/децилитар  
NKX2-1 (TTF-1) - тироиден транскрипциски фактор 1  
OR - odds ratio (веројатност на изложеност)

РАХ8 - paired box 8 ген  
PCR – polymerase chain reaction (полимераза верижна реакција)  
ПЈОД - парцијален јоден органификациски дефект  
ROC – receiver operating characteristics  
СХ – субклинички хипотироидизам  
SD – стандардна девијација  
Т3 - тријодтиронин  
Т4 – тироксин  
ТД – тироидна дизгенеза  
ТГ - тиреоглобулин  
ТЈОД - тотален јоден органификациски дефект  
ТРО – тироидна пероксидаза (тиреопероксидаза)  
ТР – тироиден рецептор  
ТРН - тиреотропен рилизинг хормон  
ТSH – тиреостимулирачки хормон  
TSHR – рецептор на тиреостимулирачки хормон  
 $^{99m}\text{TcO}_4^-$  техенциум пертехнетат  
fT4 - слободен тироксин  
FOXE-1 (TTF-2) - тироиден транскрипциски фактор 2  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – водороден пероксид  
CI – confidence interval (интервал на доверба)  
ЦНС – централен нервен систем

## 1. ВОВЕД

Тироидните хормони имаат клучна улога во линеарниот раст и матурација на тироидно-зависните ткива вклучително и мозокот. Бројни физиолошки фактори можат да влијаат на феталната и неонатална тироидна функција, како ембриогенезата на тироидната жлезда, фетално-мајчиниот однос, динамичките промени на тироидните хормони на раѓање, синтезата и транспортот на тироидните хормони и механизмите со кои се регулира нивната функција. За разбирање на пореметувањата кои може да настанат неопходно е кратко потсетување на тироидната физиологија и ембриологија.

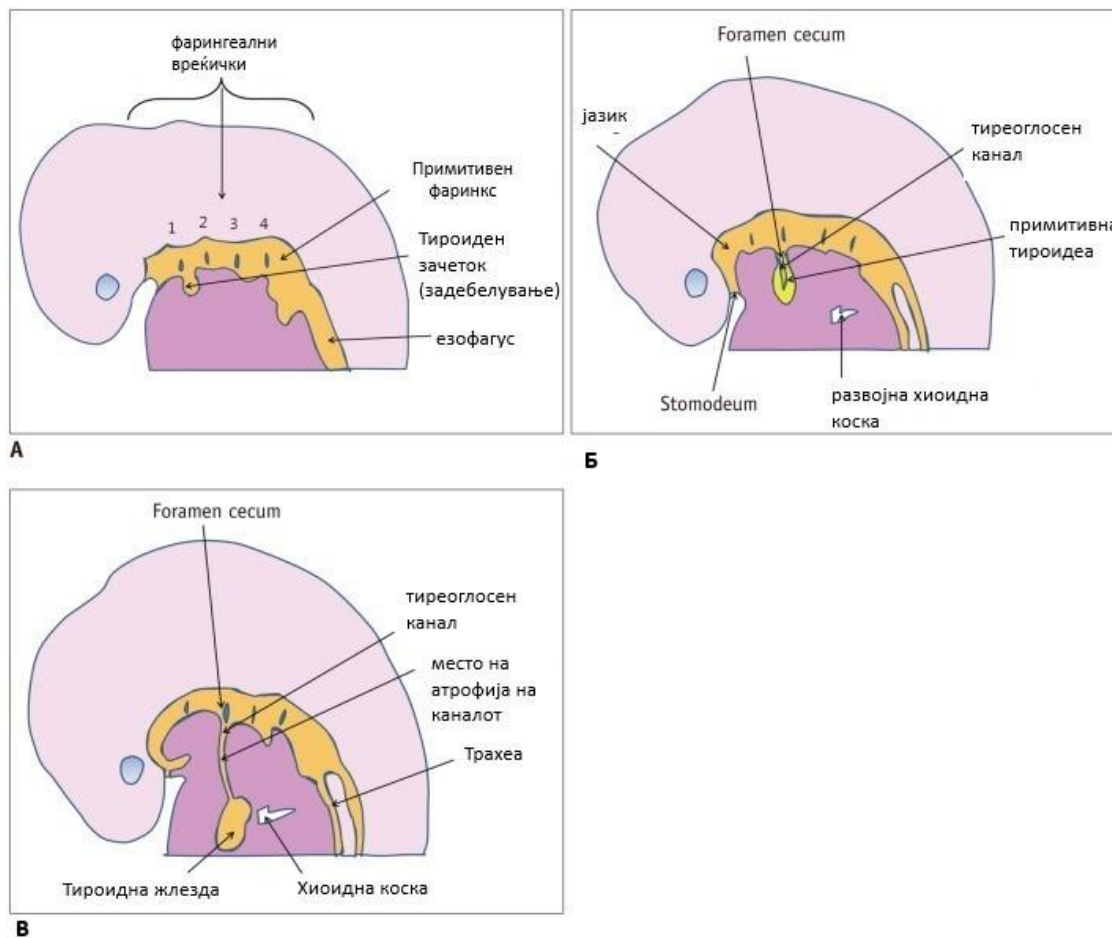
### 1.1 Онтогенеза на тироидната функција кај фетусот и новороденчето

#### 1.1.1 Ембрионален развој на тироидната жлезда

Онтогенезата на тироидната функција го опфаќа развојот и матурацијата на феталната тироидна жлезда и хипоталамично-хипофизно-тироидната оска. Развојот на тироидната жлезда најпрво се забележува на дното од примитивниот фаринкс помеѓу 20-от и 22-от постконцепциски ден.(1) Ендодермалните епителни клетки формираат тироидна евагинација (задебелување) и притоа се издвојуваат од околните ткива, а процесот е означен како спецификација. Дефекти настанати во овој процес ќе резултираат со тироидна агенезија. Во текот на втората фаза од раната морфогенеза, тироидната евагинација го населува околниот мезенхим формирајќи вреќеста формација која пролиферира и мигрира од долниот ѕид на примитивниот фаринкс по медијалната линија на предната страна од вратот. Примитивната тироидна жлезда ја добива својата билобуларна структура во периодот од 24 до 32-от постконцепциски ден, а стигнува до својата нормална претрахеална позиција помеѓу 48 и 50-ти ден.(1)

Во тој период и парафоликуларните (С-клетки), кои потекнуваат од нервниот гребен ја населуваат тироидната жлезда. Околу 51-от постконцепциски ден процесот на лобулација е сосем завршен и тироидната жлезда го има својот конечен надворешен

изглед. Тироеглосниот канал кој се протега од foramen cecum до нормалната тироидна позиција може да е сеуште присутен и се состои од дегенерирани фоликуларни клетки. (1) На слика 1 е претставен ембрионалниот развој на тироидната жлезда.

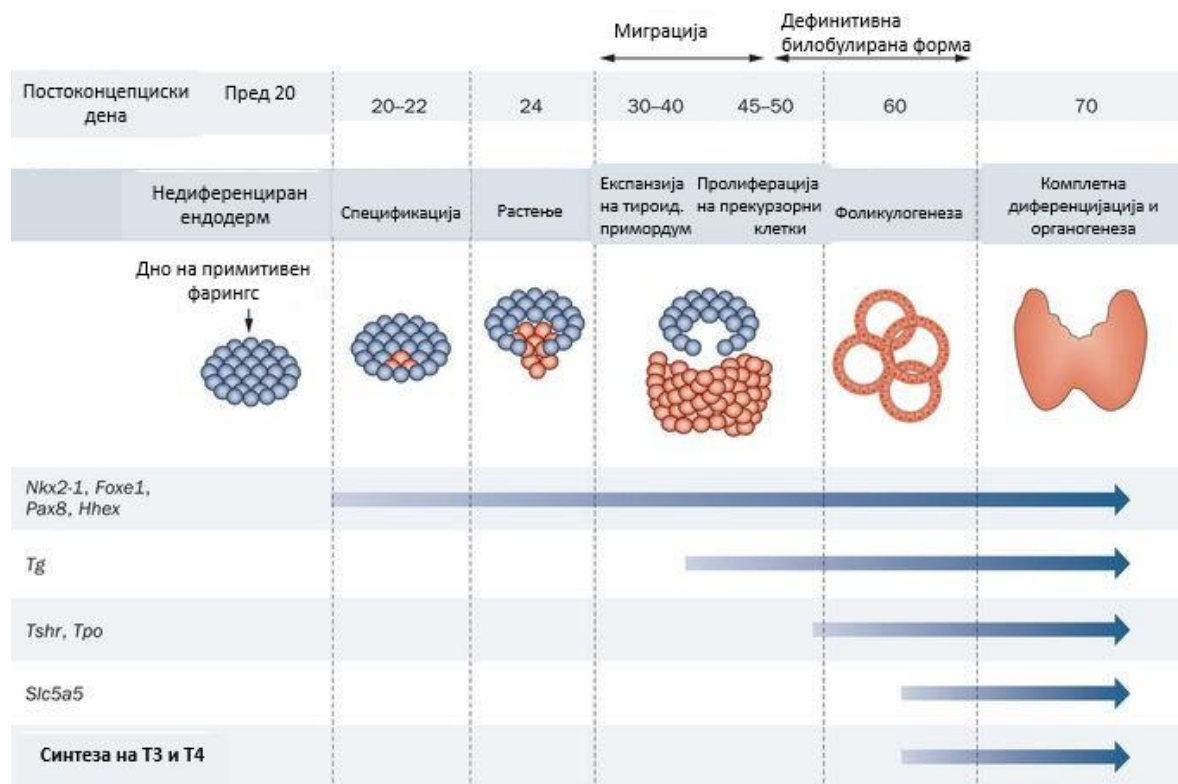


Слика 1. Нормална тироидна ембриогенеза.

**А.** Тироидната жлезда се развива од средишното ендодермално задебелување на дното од примитивниот фаринкс, помеѓу првиот и вториот фарингеален лак. Ова задебелување брзо станува вреќеста формација означена како тироиден примордиум или примитивна тироидеа. **Б.** Тироидниот примордиум е иницијално вглабнат, но за кратко станува солидна формација која се дели на лев и десен лобус. **В.** Развојната тироидна жлезда се спушта по должината на вратот. Тироидната жлезда кратко време е поврзана со јазикот со еден тесен канал, означен како тироеглосен канал. Во седмата гестациска недела таа ја добива својата конечна форма и ја достигнува нормалната позиција на вратот.

Терминалната диференцијација на тироидната жлезда претставува комбинација на структурни и функционални промени и настанува кога миграцијата е комплетна (10-12 гестациска недела). Структурните промени опфаќаат поларизација и адхезија на индивидуалните тироидни фоликуларни клетки и формирање на фоликули, кои претставуваат функционална единица на тироидната жлезда. Структурната диференцијација на тироидната жлезда хистолошки може да се класифицира како: преколоид, почетен колоид, и фоликуларна фаза. Преколоидниот стадиум е присутен помеѓу 7-та и 9-та гестациска недела, кога тироидната жлезда се состои од низи на неполаризирани прекурсори на тироидните фоликуларни клетки. Почетниот колоиден стадиум се карактеризира со присутни мали фоликули од поларизирани тироидни фоликуларни клетки и е присутен од 10-тата до 11-тата гестациска недела. Од 12-тата гестациска недела настанува фоликуларната фаза.(2) На функционално ниво, поларизираните тироидни фоликуларни клетки стекнуваат способност за синтеза на тироидни хормони во луменот на фоликулите. За синтезата на тироидните хормони неопходни се три клеточни механизми: активно внесување на јодот на базолатералната мембрана, синтеза на тиреоглобулинот и генерирање на  $H_2O_2$  (водороден пероксид) на апикалната мембрана. Феталната тироидна жлезда станува способна за акумулација на јод и синтеза на тироидните хормони во тек на почетната колоидна фаза. (2) Тироидните хормони се детектираат во феталната тироидната жлезда од 11-та гестациска недела, а во феталната циркулација од 12-та гестациска недела. (3,4)

Тироидната ембриогенеза зависи од експресијата на програмираните homeobox секвенци и транскрипциски фактори, вклучувајќи ги тироидниот транскрипциски фактор 1 (TTF-1, познат уште и како NK2 homeobox-1, NKX2-1), тироидниот транскрипциски фактор 2 (TTF-2, познат уште и како Forkhead box E1 -FOXE-1) и paired box генот 8 (PAX8). (5) (Слика 2)



Слика 2. Експресија на тироидните транскрипциони фактори во различните стадиуми на тироидната ембриогенеза. (Прифатено од: Thyroid transcription factors in development, differentiation and disease by Fernandez L et al. Nature Reviews Endocrinology 2015.)

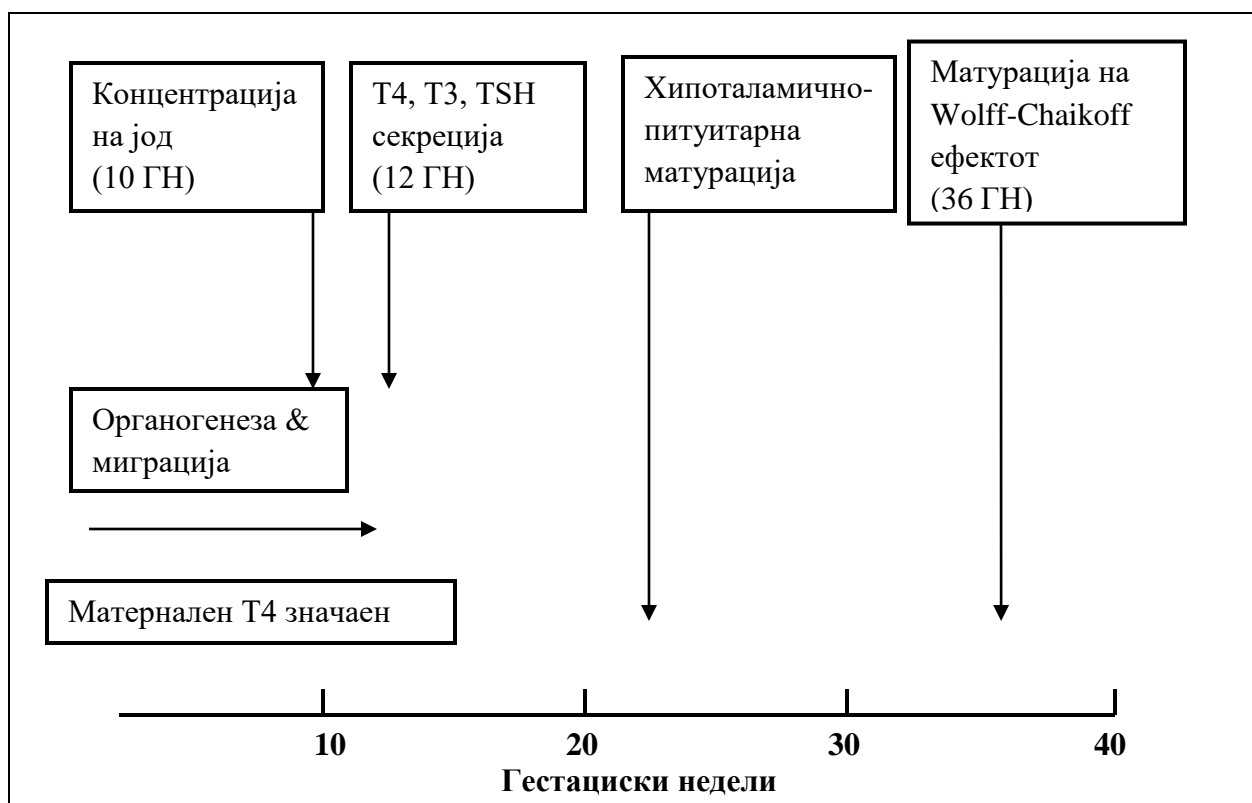
### 1.1.2 Хипоталамично-хипофизна оска

Матурацијата на тироидната функција кај фетусот ги изразува промените кои настануваат на сите три нивоа: хипоталамусот, хипофизата и тироидната жлезда.

Хипоталамично-питуитарно-тироидната оска почнува да функционира кон средината на гестацијата. Тиреотропинот се детектира во феталниот серум уште во 12-тата гестациска недела со вредности од 3-4 mU/l, а неговата концентрација се зголемува од 18-тата недела до крајот на бременоста. (2) Созревањето на хипоталамо-хипофизно-тироидната оска кое завршува во 25-тата гестациска недела најдобро се демонстрира со феталниот тиреотропен одговор кон егзогено администриран тиреотопен рилизинг хормон (TRH) кај мајката, но и

со прогресивниото зголемување на односот слободен тироксин (FT4)/триеотропин во феталната крв во третиот триместар од бременоста. (6)

Серумските вредности на TRH во феталната циркулација се повисоки отколку во серумот на мјаката, што е резултат на екстрахипоталамична синтеза на TRH (во плацентата и панкреасот) и намалената активност на TRH деградационите ензими во феталниот серум. Физиолошкото значење на овие повисоки вредности на TRH во феталната циркулација сеуште не е разјаснето. На Слика 3. шематски се прикажани најзначајните стадиуми во тироидната ембриогенеза и матурација.



Слика 3. Најзначајни стадиуми во ембриогенезата на тироидната жлезда

Ембриогенезата е во голем степен завршена помеѓу 10 и 12-тата недела. Тироидните хормони, и тироксинот и тријодтиронинот се детектираат во серумот на фетусот од 11 до 12 гестациска недела, а една фракција од T4 детектиран во оваа фаза од гестацијата всушност претставува матерналниот тироксин кој ја преминува плацентата. Способноста за концентрација на јод во феталната тироидна жлезда се детектира уште во 10-11 недела, но матурацијата на Wolff-Chaikoff ефектот (редукција на складирањето на јодот како при изложеност на вишок на јод) настанува дури кон крајот на гестацијата (36-40 недела).

### 1.1.3 Механизми на дејствување на тироидните хормони

Тироидните хормони тироксин (Т4) и тријодтиронин (Т3) претставуваат хидрофобни јодинирани молекули кои циркулираат врзани за серумски протеини, воглавно тироид-врзувачкиот протеин. Неврзаната, односно слободна („free“) фракција од Т4 и Т3 е биолошки активна и таа навлегува во целните клетки со процесот на пасивна дифузија. Дејството на тироидните хормони во клетките настанува со нивното врзување за тироидните рецептори (ТР) лоцирани во клеточното јадро. ТР претставуваат нуклеарни протеини и како и останатите интрацелуларни протеини ги содржат сите функционални домени: транскрипцискиот активирачки домен, ДНА-врзувачки домен и хормон врзувачки домен. Постојат два типа на тироидни рецептори означени како ТР алфа и ТР бета, кои понатаму се поделени на субтипови алфа 1 и 2 и бета 1 и 2. (7) ТР алфа 1 е предоминантно застапен во коските, гастроинтестиналниот систем, срцето и мозокот. ТР бета 1 е присутен во црниот дроб, бубрезите, срцето, белите дробови, мозокот, кохлеата и хипофизата. (7) ТР се однесуваат како ДНА-врзувачки транскрипциони фактори кои ја регулираат генетската транскрипција. Иако Т4 е предоминантниот циркулирачки тироиден хормон, Т3 се смета за биолошки активен бидејќи тој има 15-пати поголем афинитет за врзување со ТР. По врзување на тријодтиронинот (Т3) за тироидниот рецептор се создава ТР-Т3 комплекс кој понатаму се врзува за тироидно одговорните елементи во промоторскиот дел на целиот ген во вид на мономер или хомодимер. ТР може и да се хетеродимеризира со ретиноид-Х-рецепторот, односно нуклеусниот рецептор за 9-цис ретиноична киселина со што се зголемува лиганд зависната транскрипциона активност на Т3. Во отсуство на Т3, тироидниот рецептор на кој нема врзано лиганд ја супримира генетската транскрипција. (7) Специфичната функција на ТР алфа и ТР бета може да се види фенотипски кај пациентите со инактивирачки мутации на соодветните гени, односно така наречениот синдром на тироксинска резистенција кој настанува најчесто како резултат на мутации на ТР бета генот, настанати *de novo* или населедени автосомно доминантно. (8)

Ниски концентрации на ТР се детектираат во феталниот мозок уште во 10-тата гестациска недела, а во црниот дроб, срцето и белите дробови помеѓу 16 и 18-тата недела.

Нивото на ТР во церебралниот кортекс и церебелумот значајно се зголемува во текот на вториот и третиот триместар од бременоста. (9) Сепак не постојат јасни податоци за тоа кога тироидните хормони почнуваат да дејствуваат кај фетусот.

Родилната должина најчесто е нормална кај атиреотичните новороденчиња, што укажува дека феталниот линеарен раст е програмиран независно од тироидните хормони и е резултат на комплексна интеракција на генетските, нутритивни и хормонални фактори како и константната интраутерина средина. Сепак кај 50 до 60% од атиреотичните деца се манифестира задоцнета епифизна матурација и имаат големи фонтанели. (10)

Критичната улога на тироидните хормони во матурацијата на централниот нервен систем е одамна позната (9,11). Развојот на нервниот систем вклучува неурогенеза, глиогенеза, миграција на нервните клетки, неуронална диференцијација, раст на дендритите и аксоните, синаптогенеза, миелинизација и синтеза на невротрансмитери. Тироидните хормони ги стимулираат и активираат развојните гени за ЦНС, а нивниот дефицит ја пореметува синхронизацијата на нормалниот развој. (12) Постојат голем број докази за постоење на критичен период на тироидно зависна мозочна матурација *in utero*. Освен тоа студиите кои ги анализираат дозата на левотироксин и времето на отпочнување на третманот кај новородените со КХ укажуваат за постоење на втор критичен период на дејство на тироидните хормони во раниот неонатален период, (13) но периодот на тироидно зависната ЦНС матурација продолжува и понатаму во животот најмалку до двегодишна возраст. (14)

#### ***1.1.4 Матурација на периферниот метаболизам на тироидните хормони***

Во активацијата и инактивацијата на тироидните хормони учествуваат три типа на јодотиронин дејодинази. Сите три ензими координирано созреваат во тек на гестацијата овозможувајќи адекватно дејствување на Т3 на ткивата, а истовремено заштитувајќи го фетусот од вишокот на тироидни хормони. Ензимот јодотиронин дејодиназа тип 1 (Д1) е значаен активирачки ензим кај адултите, но неговата концентрација е ниска во бременоста. Освен што ја катализира конверзијата на тироксинот во тријодотиронинот, Д1

ја катализира и инактивацијата на сулфатните коњугати на Т4. Како резултат на тоа циркулирачките концентрации на Т3 кај фетусот се ниски додека серумските вредности на биолошкиот инактивен изомер реверзен Т3 и Т3 сулфат се зголемени. За разлика од Д1, двата други ензими, дејодиназа тип 2 (Д2) и дејодиназа тип 3 (Д3) се присутни во феталниот мозок уште во 7-мата гестациска недела. (7) Д2 го конвертира Т4 во Т3 додека Д3 го конвертира Т4 во реверзен Т3. Д2 и Д3 се најзначајните изоформи на дејодиназните ензими кај фетусот и тие го регулираат нивото на Т3 во мозокот и питуитарната жлезда. (7,15) Плацентарниот Д3 има особено значење бидејќи го штити фетусот од вишокот на тироидни хормони од мајката присутни во плацентарната циркулација или во амнионската течност. При хипотироидизам пак активноста на Д2 се зголемува, а на Д3 се намалува. И покрај тоа што во циркулацијата на фетусот перзистираат ниски вредности на Т3 во текот на бременоста, вредностите на Т3 во феталниот мозок изнесуваат од 60-80% од вредностите кај адултите уште во 20-26 гестациска недела. (15) Според претходно изнесеното, може да се заклучи дека овие координирани активности меѓу различните дејодинази кај фетусот и во плацентата се програмирани на тој начин што овозможуваат и при ниска вредност на циркулирачкиот Т3 да се одржува оптимална концентрација на Т3 во феталниот мозок, а со тоа и негов нормален развој што не е случај постнатално.

## **1.2 Улога на плацентата**

### ***1.2.1 Плацентарен трансфер на јод, тироксин и имуноглобулини***

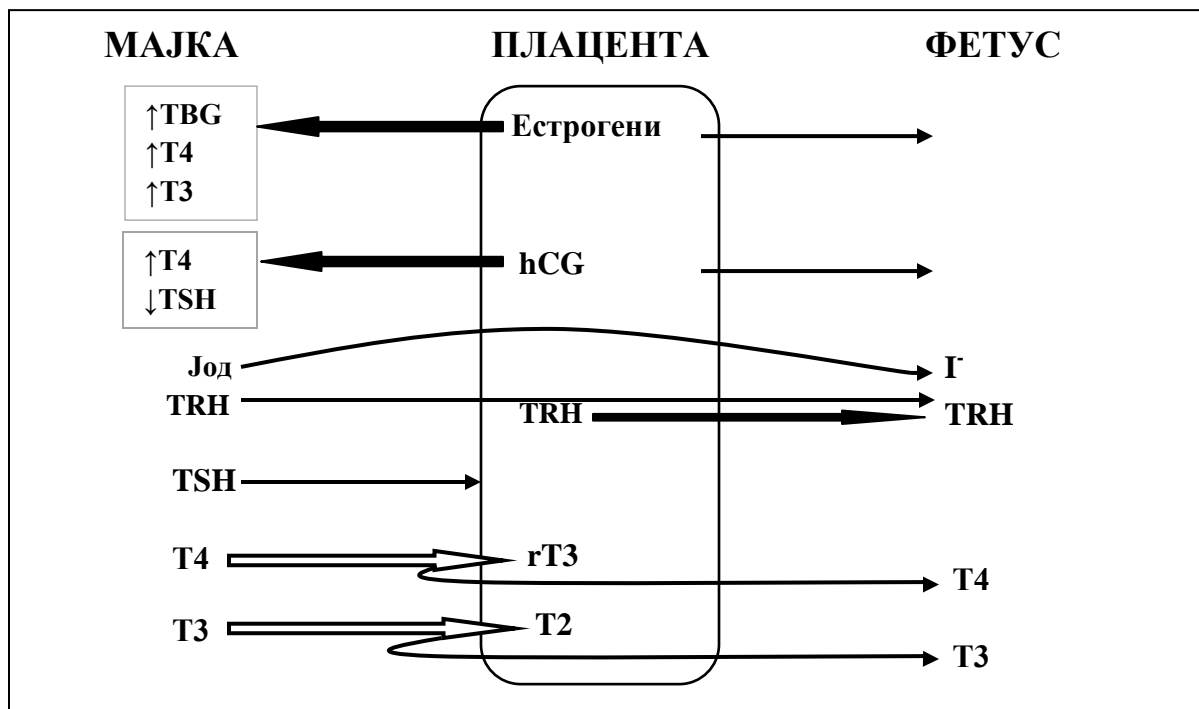
Плацентата го експресира натриум-јод симпортерот во текот на гестацијата со што се објаснува влијанието на мајчиниот јоден статус на фетусот. (16) Доколку мајчиниот јоден внес е субоптимален, феталната тироидна жлезда не може да обезбеди адекватна количина на јод и настанува хипотироидизам кај детето. Превенцијата на оваа состојба со адекватен внес на јод од страна на мајката претставува еден од најзначајните примери за фетален третман преку неговата мајка. (17) За разлика од јодот, долго време се сметаше дека тироксинот (Т4) во ниски концентрации не ја поминува плацентарната бариера. Сепак, докажано е дека Т4 се детектира во ембрионските ткива уште пред созревањето на

феталната тироидна жлезда, што укажува на неговото мајчино потекло.(18) Тироксинот преминува од мајката на фетусот и понатаму во текот на бременоста, бидејќи и норворенчињата со комплетно отсутна тироидна функција во умбиликалната циркулација имаат 30-50% концентрација на тироидни хормони во споредба со нормалните новородени. (18)

Сите овие податоци укажуваат дека матерналниот тироксин ја преминува плацентата во текот на гестацијата, но во одредени физиолошки граници. Сепак, трансплацентарниот трансфер на тироксин не е доволен да се спречи појава на гушавост кај фетуси со тешка дисхормоногенеза. Феталната гушавост може да биде голема до тој степен што ќе го поремети протокот на амнионската течност во дишните патишта и ќе предизвика хидрамнион. Во исклучително тешки случаи е индицирано пренатално администрирање на инјекција левотироксин интраамнионски како фетална терапија. (19)

Освен тироксинот, плацентата ја поминуваат и имуноглобулините тип Г (IgG) така што кај новороденчињата од мајки со Graves-ова болест може да настане транзиторен хипертироидизам, а кај новороденчињата од мајки со Hashimoto тироидитис транзиторен хипотироидизам поради трансплацентарниот трансфер на TSH-рецептор активирачките антитела, односно TSH-рецептор блокирачките антитела. Иако на овој хипотироидизам припаѓаат помалку од 2% од случаите на конгенитален хипотироидизам откриен на скрининг, неопходно е следење на тироидната функција кај новороденчињата кои имаат анамнеза за тироидна болест кај мајката. (7)

На Слика 4. е објаснета комплексната улога на плацентата во тироидниот метаболизам во текот на гестацијата



**Слика 4. Улога на плацентата во тироидниот метаболизам во текот на бременоста.**

Плацентата продуцира естрогени и хуман хорионски гонадотропин (hCG), кој ја зголемува концентрацијата на тиреоглобулинот и стимулира зголемена продукција на тироидни хормони кај мајката. И естрогените и hCG имаат тенденција за зголемување на T4 и T3 во мајчината циркулација и ја инхибираат скересијата на TSH. Јодот и тирео-рилизинг хормонот (TRH) ја преминуваат плацентата. Освен тоа и плацентата синтетизира TRH. Плацентата не е пермеабилна за TSH, а е делумно пропустлива за T4 и T3. Плацентарниот ензим тип 3 дејодиназа го деградира T4 во rT3 (реверзен, инактивен T3), а T3 понатаму во 3,3'T2. Плацентата, исто така, е пермеабилна за тиоуреа медикаментите кои се користат за третман на Graves-ова болест.

### 1.3 Тироидна функција во неонатална возраст

Значителни промени настануваат во тироидната физиологија за време на раѓањето на новороденчето. Концентрацијата на серумскиот TSH кај фетусот се зголемува од 18 -20 гестациска недела па се до крајот на бременоста кога достигнува највисока вредност, помеѓу 7 и 10 mIU/L. Во текот на породувањето и непосредно после тоа како резултат на

изложеноста на новороденчето на екстраутерината студена средина настанува акутно ослободување на TSH, при што се достигнува највисока концентрација на TSH од околу 70 mIU/L 30 минути по раѓањето. Оваа хиперсекреција на TSH перзистира во текот на наредните 6 до 24 часа. Како одговор на зголемената продукција на TSH настанува постепено зголемување на концентрациите на серумските тироидни хормони. (20) Постнатално концентрациите на T3 и T4 во серумот се зголемуваат од 2 до 6 пати во текот на првите неколку часа од животот, и достигнуваат највисоки вредности во текот на вториот постнатален ден. (Слика 5). Концентрациите на T3 повеќе се зголемуваат во споредба со концентрациите на T4 и FT4 поради зголемената периферна конверзија на T4 во T3, односно се зголемува активноста на D1 ензимот, а се намалуваат вредностите на реверзниот T3 и T3 сулфат. **Според тоа, новороденчето има физиолошка хипертиреотична состојба во првите денови од животот.** Биохемиско отсуство на ваква хипертиреотична состојба укажува на постоење на конгенитален хипотироидизам. Покачените вредностите на тироидните хормони перзистираат во тек на првите 2 недели од животот, а потоа почнуваат значително да се намалуваат достигнувајќи ги нормалните вредности помеѓу 4 и 6 недели од раѓањето. (20) (Слика 5).

### ***1.3.1 Прематурни новороденчиња***

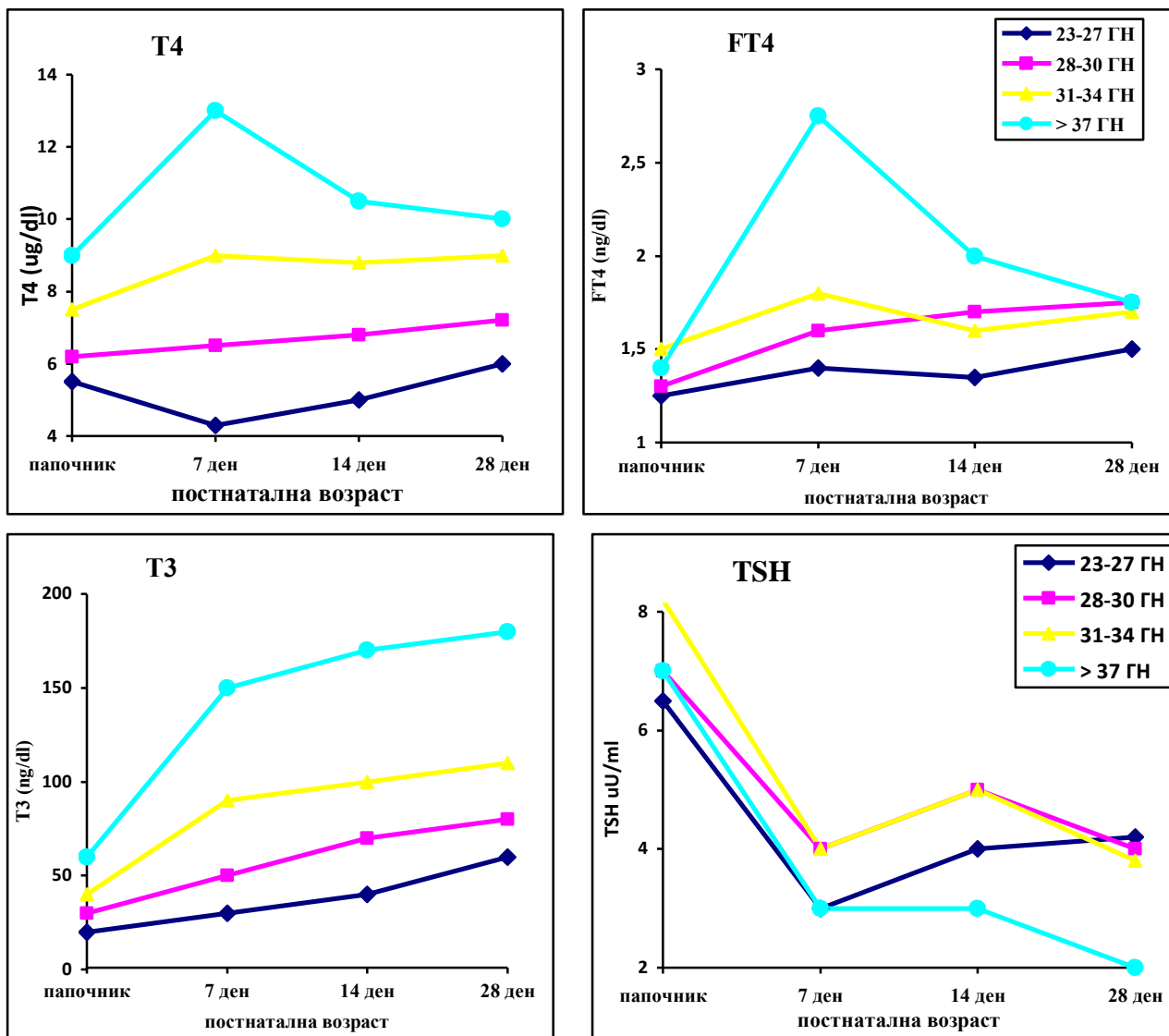
Тироидната функција кај прематурните новородени во одреден степен ја одразува релативната незрелост на хипоталамично-питуитарно-тироидната оска и е компарабилна со гестациската старост in utero. По раѓањето постои пораст на T4 и TSH аналогно на терминските новородени, но магнитудата на ова зголемување е помала кај прематурните новороденчиња. (6) Кај претерминските новородени, родени пред 31-та гестациска недела, циркулирачките концентрации на T4 некогаш не се зголемуваат, односно дури може да настане дури и пад на нивните вредности во 1-вата до 2-та недела од животот. (6) (Слика 3). Ова е особено значајно кај екстремно прематурните новородени, бидејќи во одредени случаи вредноста на T4 е толку ниска што не може да се одреди во серумот. Причините за постнаталното намалување на T4 кај претерминските новородени се комплексни, и тоа

почнувајќи од незрелоста на тироидната жлезда за јодна регулација се до супресивното дејство на различни медикаменти и средства на кои се тие често изложени (допамин, стероиди, јодни антисептици). (21)

Во студијата на Frank и сор. преваленцата на концентрација на TSH > 40 mIU/l кај новородени со многу мала родилна тежина (< 1.5 kg) била 8 пати поголема одколку кај новороденчињата со мала родилна тежина (1.5 kg-2.5 kg), а 2 пати поголема споредено со терминските новородени. (22) Додека кај одредени случаи оваа зголемена вредност на TSH значи вистински конгенитален хипотироидизам, кај поголемиот број прематурни новороденчиња покачениот TSH е еквивалент на она што се забележува кај возрасните во фаза на опоравување од сериозна болест.

### ***1.3.2 Новородени мали за гестациска возраст (SGA)***

Новороденчињата родени мали за гестациската возраст имаат значително повисоки вредности на TSH и пониски вредности на тотален и слободен T4 споредено со новородените со нормална тежина. (23) Ова е поврзано со тежината на малнутрицијата кај овие деца и нивното интраутерино страдање (фетална хипоксија и ацидемија), како резултат на хроничното гладување или пореметената плацентарна перфузија. Концентрацијата на TSH кај новородените се нормализира помеѓу 3-от и 10-от постнатален ден без разлика на гестациската старост.



Слика 5. Постнатални промени на T4, слободен T4 (FT4), T3 и TSH според гестациската старост. Се забележува зголемување на концентрациите на T4, FT4 и T3 во првата постнатална недела кај терминските новороденчиња. Ова зголемување е помалку изразено кај новороденчињата родени пред 35 ГН, а не е присутно кај рано прематурните новородени, кај кои концентрацијата на тироидните хормони може да се намали. Прифатено од *Disorders of the thyroid gland in infancy, childhood and adolescence*, by Maria Segni, MD, in <http://www.thyroidmanager.org/>, the free online Thyroid Web-book, update March 18, 2017, (published by Endocrine Education, Inc., South Dartmouth, MA.)

## **1.4 Конгенитален хипотироидизам**

### **1.4.1 Дефиниција и класификација**

Конгениталниот хипотироидизам (КХ) претставува дефицит на тироидни хормони одредени на раѓање или постнатално, а присутен уште интраутерино. Во подрачјата кои се јодно суфицилни, тироидната инсуфициенција настанува како резултат на пореметувања на хипоталамично-хипофизно-тироидната оска. Примарниот КХ претставува дефект на тироидната жлезда, додека секундарниот или терциерниот КХ, заедно означени како централен КХ настануваат како резултат на дефект на питуитарната жлезда (хипофизата) или хипоталамусот. (24)

Асоцијацијата на хипотироидизмот со менталната ретардација е одамна позната, а раното поставување на дијагноза и отпочнување со терапија е неопходно за превенција на иреверзибилни оштетувања на мозокот и појава на кретенизам (11,12,13,25).

Клиничките знаци на хипотироидизам многу ретко се присутни на раѓање, односно над 95% од новороденчињата со конгенитален хипотироидизам се асимптоматски, што го прави неговото рано клиничко дијагностицирање особено тешко. Тоа се должи на динамичките промени на тироидната функција на раѓање, ограниченото дејствување на тироидните хормони врз периферните ткива се до доцната гестациска возраст и трансплацентарниот трансфер на мајчините хормони. (24,26) Со развојот на сензитивен и специфичен радиоимуноесеј од страна на Dussault и сор. за мерење на Т4 во исушена капка крв нанесена на филтер хартија (подоцна мерење на TSH и Т4), се овозможиле технички услови за скрининг на сите новороденчиња пред појавата на клинички манифестации на болеста. (27)

### **1.4.2 Етиологија и патогенеза**

Етиолошката класификација на конгениталниот хипотироидизам е претставена во Табела1.

Табела 1. Етиолошка класификација на конгениталниот хипотироидизам:

<p><b>Примарен конгенитален хипотироидизам</b></p>	<p><b><u>Тироидна дизгенеза</u></b></p> <p><b>Пореметување на тироидната органогенеза</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Агенезија</u> (Атиреоза)</li> <li>• <u>Дизгенеза</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Тироидна жлезда нецелосно спуштена или ектопично поставена (ектопија)</li> <li>- Остаток од тироидна жлезда во нормална позиција (хипоплазија „in situ“)</li> </ul> </li> </ul> <p>Ретки синдромски форми на тироидна дизгенеза- мутации во:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• GNAS (Albright остеоидистрофија)</li> <li>• PAX8 (бубрежна агенезија/ други генито-уринарни малформации)</li> <li>• TTF-1/NKX2-1 (со белодробна болест, хореоатетоза)</li> <li>• TTF-2/FOXE1 (Bamforth–Lazarus Syndrome -атиреоза со расцеп на непцето и spiky hair)</li> </ul>
	<p><b><u>Тироидна дизхормоногенеза</u></b></p> <p><b>Вродени пореметувања на синтезата или метаболизмот на тироидните хормони</b> (структурно нормална или зголемена тироидна жлезда)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Дефекти на внес на јод</u> (натриум/јод транспортер)</li> <li>• <u>Дефекти на јодна органификација</u> (оксидација) <ul style="list-style-type: none"> <li>- без глувост /со глувост (Pendred синдром)</li> </ul> </li> <li>• <u>Дефекти во соединувањето на јодотирозините</u></li> <li>• Дефекти во синтезата на тиреоглобулин</li> <li>• Дефекти во дејодиназниот систем <ul style="list-style-type: none"> <li>- генерализирани</li> <li>- само во тироидната жлезда</li> <li>- само во периферните ткива</li> </ul> </li> <li>• Резистенција на периферните ткива на тироидни хормони</li> </ul>
<p><b>Транзиторен хипотироидизам</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Матернални причини</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Дефицит на јод/ Зголемена експозиција на јод</li> <li>Блокирачки TSH-R антитела</li> </ul> </li> <li>• <b>Фетални абнормалности</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Конгенитални малформации; Down синдром</li> </ul> </li> <li>• <b>Постнатални проблеми</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Хипоксија, сепса, ексангвиотрансфузија</li> </ul> </li> <li>• <b>Идиопатски</b></li> </ul>
<p><b>Централен конгенитален хипотироидизам</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Изолиран дефицит на TSH-алфа субединицата</li> <li>• Абнормалности во развојот на хипоталамус-хипофиза (мултипли хормонски пореметувања-панхипопитуитаризам)</li> <li>• Midline конгенитален дефект (септо-оптичка дисплазија, холопросенцефалија)</li> <li>• Стекната мозочна траума (хеморагија, менингитис, хидроцефалус, траума) (вообичаено хипоталамичен TRH дефицит)</li> </ul>

## **1.5 Тироидна дизгенеза**

Тироидната дизгенеза (ТД) претставува најчеста етиологија на перманентниот примарен КХ со застапеност од 80-85% од случаите со конгенитален хипотироидизам.

ТД настанува поради различни дефект во ембриогенезата, може да биде комплетна или парцијална и резултира со различен спектрум на развојни абнормалности на тироидната жлезда од 1) агенезија или атиреоза, односно комплетно отсуство на тироидната жлезда како резултат на пореметување на прекурсорите на тироидните фоликуларни клетки, 2) ектопична тироидна жлезда како резултат на предвремен прекин на нормалниот процес на миграција, или 3) хипоплазија на нормално позиционирана жлезда. (24)

Најчестиот развоен дефект на тироидната жлезда, на кој отпаѓаат околу половина од случаите со конгенитален хипотироидизам претставува пореметување на миграцијата на примитивната тироидна жлезда кој резултира со ектопична (најчесто сублингвална) тироидеа. Ектопичните тироидни жлезди може да се локализираат на било кое место по средната линија помеѓу foramen sесum на јазикот до нејзината вообичаена ортотопична претрахеална позиција. Ектопичните жлезди се вообичаено со округла форма и не се лобулирани, а хистолошки се различни од нормалната фоликуларна тироидна структура. Иако може да постои одредено функционално тироидно ткиво најголем број од пациентите со тироидна ектопија се хипотиреотични и се детектираат на неонатален скрининг со јасно покачени вредности на TSH. Тироидните ектопии единствено и недвосмислено се визуелизираат со радионуклеидна скинтиграфија. (28)

Пациентите пак со тироидна хипоплазија според биохемиските параметри може да имаат различен степен на хипотироидизам. Значително поретки варијанти на тироидна дизгенеза претставуваат агенезија на тироидниот истмус или хемиагненезија, односно отсуство на еден, најчесто левиот тироиден лобус. Овие пациенти се најчесто еутиреотични иако дел од нив се со хипотироидизам и претставуваат најумерените форми на ТД. (26,29)

### **1.5.1 Генетика на тироидните дизгенези**

ТД во најголем број од случаите претставува спорадична болест. Иако и генетските и факторите од околината имаат свое влијание, етиологијата на тироидните дизгенези во голем дел сеуште е неразјаснета. Зачестената појава на ТД во одредени фамилии, поголемата преваленца на ТД кај некои етнички групи, како и почестата застапеност кај женскиот пол укажуваат на улогата на генетските фактори во етиопатогенезата на тироидните дизгенези. (30) Во студијата на Castanet и сор. од 2500 пациенти со тироидни дизгенези детектирани на неонатален скрининг, опишани се 67 фамилијарни случаи, од 32 сложени фамилии. Бројот на ТД кај роднини од прв степен бил 15-пати поголем во споредба со очекуваната инциденца што јасно укажува на генетска компонента на ТД. Кај одредени случаи наследувањето од родителите на децата било автосомно доминантно, со различна и некомплетна генска пенетрација. (31) Исто така, опишана е значајна клиничка варијабилност на фенотипот на ТД како помеѓу различни фамилии, така и во рамките на исти фамилии (на пр. постоење на атиреоза и ектопија во иста фамилија) што укажува на генетска хетерогеност. Може да се заклучи дека постојат јасни аргументи за генетска основа на ТД која не ги следи Меделовите правила на наследување и покрај моногенетските, улога имаат и полигенетските и епигенетските механизми. (31)

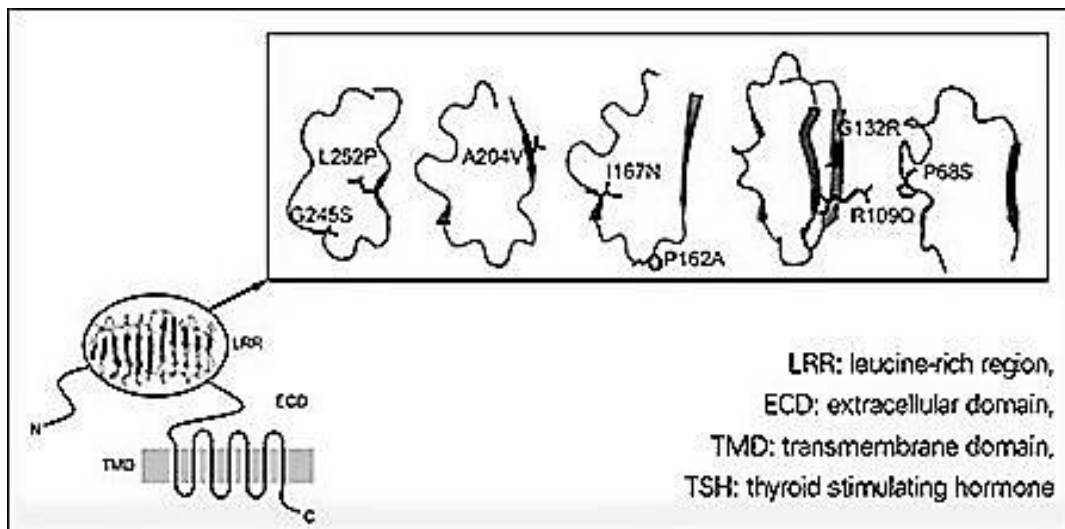
### **1.5.2 Моногенетски форми на ТД**

Моногенетските ТД може да се поделат на синдромски и несиндромски форми. Транскрипционите фактори *PAX 8*, *NKX 2.1 (TTF 1)*, *FOXE 1 (TTF 2)* се очигледни кандидатски гени со оглед на нивната важна улога во тироидната ембриогенеза и нивната специфична тироидна експресија. Освен овие кандидатски гени, мутации во *TSHR* генот биле идентификувани и функционално карактеризирани кај поголем број на пациенти со ТД. Иако со присуството на мутации во овие гени јасно се дефинирани моногенетските форми на несиндромски и синдромски ТД, ниту еден од овие четири гени нема критична улога во патогенезата на тироидните дизгенези на што укажува многу малиот процент на детектирани мутации кај пациентите со ТД и покрај нивното систематско скринирање. (24)

До сега во литературата се објавени студии од Јапонија во која се скринирани сите гени (*TSHR*, *PAX8*, *FOXE-1*, *NKX2-1*, *NKX2-5*) асоцирани со ТД кај 102 пациенти. Најдени биле две мутации во *PAX8* генот, 3 хомозиготни и 3 хетерозиготни мутации во *TSHR* генот. Преваленцата на генетски форми на ТД изнесувала 9% и таа е повисока во однос на претходно објавените студии. (32, 33)

Мутациите на *TSHR* генот предизвикуваат TSH резистенција со хипопластична или нормално развиена тироидна жлезда и без асоцирани малформации. Мутациите на *TSHR* всушност се најчестите мутации кај тироидните дизгенези и се карактеризираат со особена фенотипска варијабилност на КХ. Тироидната функција варира од тежок хипотироидизам со силно хипопластична тироидна жлезда, без акумулација на радиотрасерот на сцинтиграфија до изолирана хипертиреотропинемија со нормална тироидна жлезда. (24) Биалелните мутации, хомозиготите и сложените хетерозиготи обично предизвикуваат потешка TSH резистенција, додека хетерозиготите се асоцирани со умерена TSH резистенција и нормална тироидна морфологија.

Објавените трудови во литература прикажуваат 4.3% преваленца на мутациите во *TSHR* генот кај пациенти со ТД, додека во студија од Кореја преваленцата изнесувала дури 16.5%. (34) Исто така, три независни студии од Италија известуваат за зголемена преваленца на *TSHR* мутации (11-29%) кај децата со хипертиреотропинемија, претставувајќи најумерена форма на тироидна резистенција.(35-37) Додека тешката TSH резистенција бара рано отпочнување со супституциона терапија, долгорочно следење е неопходно кај умерените форми каде тироидните хормони можат да бидат нормални со години, а компензацијата на умерената TSH резистенција ќе резултира единствено со TSH елевација. Структурата на TSH рецепторскиот протеин како и фенотипските карактеристики на *TSHR* мутациите се претставени на слика 6 и табела 2.



Слика 6. Структура на TSH рецепторот, кодиран од *TSHR* генот (хромозом 14q31). Содржи 7 трансмембрански домени (ТМД), кои ги активираат класичните G-протеин врзувачки ефектори, аденилатциклаза (AC) и фосфолипаза C и голем екстрацелуларен домен (ЕЦД). ЕЦД е кодиран од првите 9 егзони, и делумно од 10-от егзон, додека ТМД и интрацелуларниот домен се кодирани од егзон 10. ЕЦД содржи реон богат со леуцин, кој е одговорен за хормон специфичниот врзувачки капацитет и е прикажан во 3Д форма.

Табела 2. Фенотипски спектрум на *TSHR* мутации

Клинички фенотип	Мутации	Тироиден фенотип	Наследување	TSH	T4
<b>Конгенитален хипотироидизам</b>	Биалелни	Тешка хипоплазија – атиреоза	АР	↑↑↑	↓
<b>Субклинички хипотироидизам</b>	Биалелни	Хипоплазија нормален	АР	↑	нормален
<b>Висок TSH (хипертиреотропинемија)</b>	моноалелни	Нормален	АД	↑	нормален

АР- автосомно рецесивно; АД – автосомно доминантно

*PAX8* генот го кодира тироидниот транскрипционен фактор кој исто така се експресира и при развојот на бубрезите. Во тироидната ембриологија е неопходен за преживување на прекурзорите на тироидните фоликуларни клетки и нивна понатамошна

диференцијација. (38) До денес во литературата се опишани 15 различни мутации во *PAX8* генот. Биохемискиот и морфолошки фенотип кај пациентите е многу варијабилен, од еутироидизам до тежок хипотироидизам, односно од нормално голема тироидна жлезда до атиреоза, дури и во рамките на иста фамилија. Хистолошката анализа на тироидното ткиво кај пациенти со *PAX8* мутации покажала многу мали фоликули, кои се компарабилни со феталното тироидно ткиво, што недвосмислено укажува на пореметување на фоликулогенезата за време на тироидната диференцијација. (24,38) Овој наод секако е во склад со тешката тироидна хипоплазија, која претставува најчест наод кај пациентите со ТД со *PAX8* мутација. Интересно е да се напомене дека кај одредени пациенти е забележана нормална тироидна жлезда при поставување на дијагнозата, а понатамошна хипоплазија при долгорочното следење, при што може да се заклучи дека *PAX8* мутациите го пореметуваат растот на тироидните фоликули интраутерино, но и постнатално. (39-41) Присуството на *PAX8* мутациите досега е испитувано во 17 кохорти на КХ пациенти, а преваленцата изнесува 1% (0-3,4%). Присуството на бубрежна агенеза/дизгенеза е ретко асоцирана малформација, а нејзиното постоење секако го зголемува сомнението за дефект во *PAX8* генот. (24)

*FOXE1* генот, или уште означен како *TTF2* – тироиден транскрипционен фактор 2 во ембрионалниот развој се експесира во тироидниот примордиум, примитивниот фаринкс и органите кои се диференцираат од него, како непцето и езофагусот и во фоликулите на косата. (24) Во развојот на тироидната жлезда е неопходен за преживување на прекурзорите на тироидните фоликуларни клетки и е единствен познат транскрипционен фактор кој влијае на миграцијата на тироидните фоликуларни клетки во текот на ембриогенезата. Со оглед на тоа, мутациите во *FOXE1* генот ќе резултираат со синдромски форми на конгенитален хипотироидизам. Досега се опишани 5 мутации во *FOXE1* (*TTF2*) генот, при што ниту еден од пациентите не бил со изолирана тироидна дизгенеза. (33,40) Според тоа, клиничкиот фенотип треба да индицира барање на мутации во *FOXE1* (*TTF2*) генот кај пациентите со ТД.

*NKX2-1* генот или уште означен како *TTF1*- тироиден транскрипционен фактор 1 е хомодомен кој содржи транскрипциски фактор од НК фамилијата. *NKX2-1* (*TTF1*) генот се експресира во тироидните прекурзори, во предниот дел од мозокот и белите дробови. (42) Во тироидната ембриологија има клучна улога во одржувањето на тироидните фоликуларни прекурзорни клетки, како и експресијата на тиреоглобулинот и тироидната пероксидаза, а во белите дробови ги регулира гените одговорни за продукција на сурфактант. Хаплоинсуфициенција на *NKX2-1* го предизвикува мозочно-белодробно-тироидниот синдром, кој се карактеризира со хипотонија на раѓање која прогредира во бенигна хередитарна хореа на возраст од 1 до 5 години, дефицит на сурфактант на раѓање кај терминско новородено и евентуално развој на интерстициелна белодробна болест подоцна и конгенитален хипотироидизам како резултат на тироидна дизгенеза. (43) Со систематска анализа на објавените студии во литература за фенотипот на вкупно 46 пациенти со мутации во *NKX2-1*(*TTF1*) генот е утврдено дека *NKX2-1* мутациите настануваат de novo или се наследуваат на автосомно доминантен начин. Само 50% од пациентите имале комплетна тријада на симптоми, 30% имале КХ и невролошко засегање, а 13% изолирана бенигна хередитарна хореа. Тироидниот фенотип пак се карактеризирал со умерена хипертиреотропинемија кај поголемиот број на пациенти, нормална тироидна морфологија кај 55%, хипоплазија или хемиагенезија кај 35%, а атиреоза само кај 10% од случаите. (44) Според тоа, за постоење на мутација во *NKX2-1* (*TTF1*) генот треба да се посомневаме кај пациентите со умерена хипертиреотропинемија со ЦНС засегање или респираторен дистрес, но и при асоцијација на бенигна хередитарна хореа и КХ по доенечкиот период.

*NKX2-5* претстава хомодомен кој содржи транскрипционен фактор од истата НК2 фамилија, а се експресира во ембриогенезата на срцето. Мутации во *NKX2-5* генот се најдени кај пациенти со конгенитални кардиопатии и тоа атријален септален дефект, вентрикуларен септален дефект и тетралогича Fallot. (45) Објавени се 3 хетерозиготни мутации кај 241 пациенти со ТД, двајца пациенти биле со тироидна ектопија и еден со атиреоза. Во неодамна публикуваната студија на van Engelen и сор. идентификувани се 7 пациенти со конгенитални кардиопатии носители на истите мутации во *NKX2-5* генот, кои

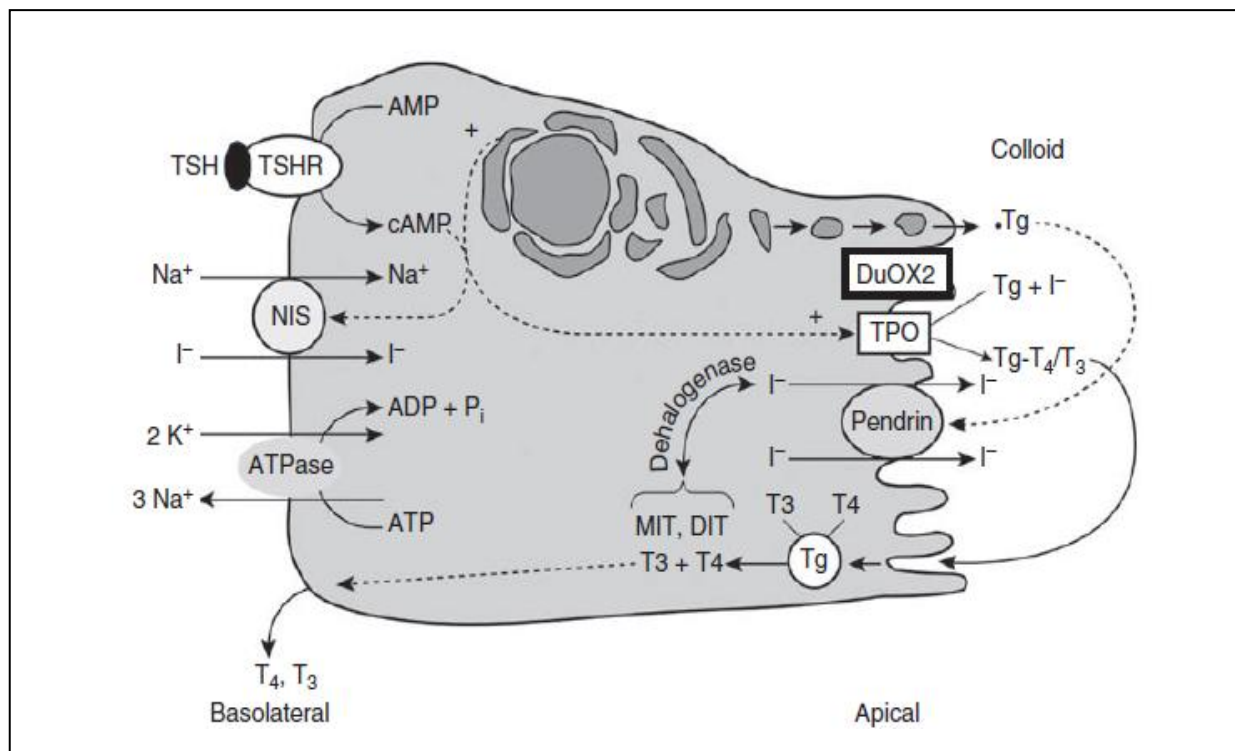
претходно биле објавени кај пациенти со ТД, но ниту еден од овие пациенти немал биохемиски или морфолошки пореметувања на тироидната жлезда. (46) Со оглед на тоа, постојат мал број докази за *NKX2-5* генот и неговата улога е контроверзна во патогенезата тироидните дизгенези. (46)

## **1.6 Тироидна дисхормоногенеза**

Вродените пореметувања на тироидната хормоносинтеза се одговорни за останатите 15% случаи со конгенитален хипотироидизам. Настануваат како резултат на различни пореметувања во било кој стадиум на тироксинската синтезата или неговиот метаболизам кои се шематски прикажани на слика 7.

Причините за тироидна дисхормоногенеза вклучуваат: 1) неможност за концентрирање на јод; 2) пореметена органификација на внесениот јод поради абнормалности во пероксидазните ензими или генерирањето на водороден пероксид ( $H_2O_2$ ); 3) пореметување на синтеза или транспорт на тиреоглобулин; 4) абнормална активност на јодотирозин дејонидазниот систем и 5) намалена осетливост на TSH. (47)

Клиничките манифестации на КХ како резултат на тироидна дисхормоногенеза се слични како и кај тироидните дизгенези со исклучок на фамилијарната појава и тенденцијата за појава на гушавост. Хиперплазијата на тироидната жлезда, односно гушавост може да бидат присутни уште во неонаталниот или доенечкиот период, но и подоцна во животот зависно од степенот и времето на појавување на хормонскиот дефицит. Останатите членови во семејството на децата со фамилијарна дисхормоногенеза обично имаат помалку изразени дефекти кои се манифестираат со гушавост, но без хипотироидизам.



Слика.7 Шематски приказ на тироидна фоликуларна клетка и најзначајните стадиуми во биосинтезата на тироидните хормони. 1) Јодот се внесува во тироцититот на базалната клеточна мембрана преку натриум-јодниот симпортер (NIS), и се движи кон апикалната клеточна површина со својот електрохемиски градиент. 2) Полипептидниот ланец на тиреоглобулинот (Tg) се синтетизира на површината од ендоплазматскиот ретикулум, а потоа влегува во Golgi-евиот систем каде гликозилацијата е комплетирана. 3) Не јодинираниот Tg се движи кон апикалната мембрана во мали везикули. 4) Tg се јодинира, со помош на ензимот тироидпероксидаза во присуство на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DUOX2 систем), а потоа моно-јодтироизините и ди-јодтироизините се спаруваат и формираат T<sub>4</sub> и T<sub>3</sub> 5) Tg ослободен со микропиноцитоза, влегува во ендозмно-лизозомалниот пат каде со протеолиза се ослободуваат тироидните хормони. 6) Моно-јодтироизините и ди-јодтироизините понатаму се дејодинираат, а ослободениот јод рециркулира со помош на ензимот DEHAL1.

### 1.6.1 Генетика на тироидните дисхормоногенези

За разлика од тироидната дизгенеза, вродените дефекти кај тироидната дисхормоногенеза се наследуваат автосомно рецесивно. Тука се вклучени дефекти на

гените за натриум-јодниот симпортер (*NIS*), тироидната пероксидаза (*TPO*), дуал оксидазата (*DUOX2*), тиреоглобулинот (*TG*), јодотирозин дејодиназа (*DEHAL1*) и TSH рецепторот (*TSHR*). Мутациите на тироидната пероксидаза се најчесто опишани како причина за тироидна дисхормоногенеза.

*Дефектите на транспортот на јод* се наследуваат автосомно рецесивно и може да бидат комплетни или парцијални. Настануваат како резултат на мутација во *SLC5A5* генот, кој го кодира натриум-јодниот симпортер и се презентираат со хипотироидизам во неонатална или доенечка возраст со присутна гушавост клинички и на ултразвук, а отсутна акумулација на радиотрасерот во вратната регија и често може да се интерпретира како атиреоза. Кај парцијалниот дефект пак постои делумна акумулација на радиотрасерот во тироидната и плунковите жлезди и пониски вредности на неонаталниот TSH. (48)

*Pendred синдром* настанува како резултат на мутации во генот *SLC26A4*, кој го кодира протеинот пендрин, специфичен транспортен протенин присутен на апикалната мембрана од тироидните фоликуларни клетки и овозможува пасивна дифузија на јодот, но и во внатрешното уво каде пак е значаен за одржување на нормалната ањонски транспорт и ендокохлеарниот потенцијал. Пациентите со *Pendred*-овиот синдром имаат асоцијација на хипотироидизам и сензонеуринална глувост. (49) Иако е вклучен во етиолошката класификација на конгениталниот хипотироидизам поради генетскиот дефект, *Pendred*-овиот синдром ретко се презентира во неонатална возраст.

Најзначајни *дефекти во оксидацијата или органификацијата на јодот* се: пореметувањата на тироидната пероксидаза (ТПО) и тоа нејзин дефект или дефицит, или ко-факторите неопходни за активација на овој ензим и 2 пореметувањата во водород пероксид ( $H_2O_2$ ) генерирачкиот систем, односно мутации во дуал оксидазата.

ТПО претставува трансмембрански гликопротеин, односно ензим кој има клучна улога во синтезата на тироидните хормони, јодинизација на тирозинските резидуи во тиреоглобулинот и нивно естерифицирање во тироксин и тријодтиронин. За негово функционирање неопходно е присуство на водорен пероксид. Клинички дефицитот на ТПО се манифестира со перманентен КХ со гушавост и висок серумски тиреоглобулин.

Комплетниот јоден органификациски дефект порано бил идентификуван со брзото и големо отпуштање на тироидниот радиојод после администрација на перхлорат со изведување на така наречениот „тест на перхлоратно отпуштање“, но овој тест не е специфичен за ТПО дефицит и може да биде позитивен и кај други дефекти. (50) Опишани се различни мутации во *TPO* генот, но не постојат воспоставени генотип-фенотип корелации. (51)

Мутации на *Дуал Оксидаза 2* и *Дуал оксидаза матурационен фактор 2*

*DUOX* (*DUOX1* и *DUOX2*) гените се експресионираат на апикалната мембрана од тироидните клетки и генерираат протеини кои имаат улога во создавањето на  $H_2O_2$ , неопходен за функцијата на тироидната пероксидаза. *DUOX2* се експресионира повеќе и е поефикасен во продукцијата на пероксид во споредба со *DUOX1*. (52) За нормално генерирање на  $H_2O_2$  неопходна е нормална функција на матурационите фактори, означени како *DUOXA1* и *DUOXA2*, кои исто така претставуваат трансмембранските протеини. (53)

Податоците од литература укажуваат на голема клиничка варијабилност кај пациентите со КХ и присутни *DUOX2* мутации. Тие може да имаат умерен или тежок хипотироидизам на раѓање со нормален или зголемен волумен на тироидната жлезда, а при ре-евалуацијата транзиторен хипотироидизам или пак перманентен, но умерен хипотироидизам со нормална тироидна жлезда. Скоро сите пациенти ќе имаат парцијален јоден органификациски дефект. За жал не постојат податоци за фенотип-генотип корелации, односно поврзаност на типот на мутацијата (труктирчка, missense, моноалелна, биалелна) и фенотипот, во смисол на нивото на TSH или степенот на перхлоратно отпуштање при изведување на перхлоратен тест. Освен интерфамилијарната варијабилност на *DUOX2* фенотипот присутна е и значителна интрафамилијарна варијабилност. (54,55)

Мутации пак во *DUOXA2* генот се опишани кај пациенти детектирани на неонатален скрининг со умерен хипотироидизам, како резултат на парцијален јоден дефицит. (56)

*Тиреоглобулинот* претставува основен субстрат за органификација и главната протеинска компонента во колоидот на тироидниот фоликуларен лумен. Генетските дефекти во тиреоглобулинскиот ген може да предизвикаат негова структурна или функционална абнормалност. Хипотироидизам со гушавост е присутен уште на раѓање со

низок или недетектибилен серумски тиреоглобулин. Во литература се опишани над 50 мутации кои резултираат со различни дефекти на тиреоглобулинскиот протеин. (57)

Кај *дефектите во дехалогеназниот систем*, односно пореметувања на дејодинацијата на монојодтиронин (МЈТ) и дијодтиронин (ДЈТ) постои намалена серумска концентрација на Т3 и Т4, високи концентрации на МЈТ и ДЈТ во серумот и урината, брза акумулација на радиојодот, а потоа и негово спонтано рапидно отпуштање. Мутации во *DEHAL1* генот, кој ја кодира јодотиронин дехалогеназата во литература се опишани кај пет фамилии, при што е забележана значајна фенотипска варијабилност дури и кај носители на исти хомозиготни мутации што укажува на веројатна улога на сеуште непознати модифицирачки гени. (58,59)

*Тироидна резистенција* – Пациентите со резистенција на тироидните хормони вообичаено имаат зголемени серумски концентрации на Т4 и Т3 и несоодветно висока концентрација на TSH. Елевацијата на TSH може да е изразита и се детектираат на неонатален скрининг. Тироидната резистенција има преваленца од 1 на 40.000 новородени и се класифицира во три фенотипа (генерализирана, питуитарна и периферна) иако оваа класификација е артефициелна со оглед на тоа што дури и пациентите носители на иста мутација може да имаат различен фенотип. (60) Наследувањето е вообичаено автосомно-доминантно, но 15-20% од случаите се јавуваат спорадично. Најчестите опишани молекуларни дефекти на рецепторот на тироидниот хормон (>80% од случаите) се во бета генот TRb1. Опишани се повеќе од 120 различни дефекти, главно единствени аминокиселински делеции или субституции во тироид врзувачкиот домен на рецепторскиот молекул. (61) Во поскоро време во литературата се опишани и првите мутации на TRa генот. (62) Третманот на тироидната резистенција претставува вистински предизвик, особено кај тешките хомозиготни форми и вклучува системски третман со бета-блокатори за заобиколување на хормонската резистенција со високи дози на тироксин или тироксински аналог. Антитироидните лекови пак резултираат со зголемување на вредностите на TSH и гушавоста и се потенцијално опасни за развој на малигнитет. (63)

Сумарно генетските дефекти асоцирани со конгенитален хипотироидизам се прикажани во Табела. 3

Табела 3. Генетски дефекти асоцирани со конгенитален хипотироидизам

Ген	Биохемиски карактеристики на хипотироидизмот	Радиолошки карактеристики	Асоцијации/значајни карактеристики
<i>NKX2-1</i>	Еутироидизам-тежок	Еутопична жлезда-атиреоза	Невролошки (БХХ, 90%случаи) Респираторни (РДС,>50%случаи)
<i>PAX8</i>	Еутироидизам-тежок	Типично хипоплазија Еутопична жлезда-атиреоза	Уринарни малформации (ретко)
<i>FOXE-1</i>	Тежок	Атиреоза	Расцеп на непце, spiky hair, хоанална атрезија
<i>TSHR</i>	Субклинички-тежок	Еутопична жлезда- тешка хипоплазија	TSH резистенција
<i>TG</i>	Еутироидизам-тежок	Еутопична жлезда-гушавост	Можна фетална гушавост TG низок/нормален покрај ↑TSH
<i>TPO</i>	Вообичаено тежок	Еутопична жлезда-гушавост ТЈОД	Можна фетална гушавост
<i>DUOX2</i>	Умерен-тежок	Еутопична жлезда-гушавост ПЈОД	КХ може да е транзиторен Граничен TSH на скрининг значајно ↑↑TSH при дијагноза
<i>DUOXA2</i>	Умерен	Еутопична жлезда-гушавост ПЈОД	КХ може да е транзиторен
<i>SLC26A4</i> ( <i>pendrin</i> )	Еутироидизам-тежок	Еутопична жлезда-гушавост ПЈОД	Сензонеурална глувост, зголемен вестибуларен акведукт
<i>NIS/SLC5A5</i>	Еутироидизам-тежок	Еутопична жлезда-гушавост Намалено тироидно прифаќање на <sup>131</sup> I/Тс	Можна е покасна презентација, со тоа и заостанување во развојот
<i>IYD</i>	Еутироидизам-тежок	Гушавост	Зголемени уринарни МЈТ и ДЈТ Можна е покасна презентација, со тоа и заостанување во развојот

БХХ-бенигна херидитарна хореа, РДС-респираторен дистрес синдром, TG-тиреоглобулин, ТЈОД-тотален јоден органификациски дефект, ПЈОД-парцијален јоден органификациски дефект, Тс- техенциум, МЈТ-моно-јодтирозин, ДЈТ-ди-јодтирозин

## **1.7 Неонатален скрининг**

Конгениталниот хипотироидзам ги поседува сите карактеристики кои се неопходни за една болест да се скринира: 1) честа застапеност; 2) неопходна е рана дијагностика и тоа во првите денови од животот за да се превенира ментална ретардација; 3) во таа возраст болеста не може клинички да се препознае; 4) постои сензитивен и специфичен скрининг тест и 5) достапен е едноставен, ефтин и ефикасен третман. (64) По спроведената пилот скрининг програма за конгенитален хипотироидзам за прв пат во Квебек, Канада во 1972 година, неонаталниот скрининг беше воведен во сите развиени земји, но и во земјите во равој на секаде во светот. Иако сеуште постојат одредени несогласувања за постоење минорни неуро-интелектуални секвели кај тешките случаи на КХ, голем број на студии прикажуваат нормален исход и кај децата со тежок хипотироидзам доколку терапијата е адекватна и отпочната рано, при што со сигурност може да се заклучи дека ерадикација на менталната ретардација како главна цел на неонаталниот скрининг е постигната. (65)

Скринингот за КХ се изведува на примероци од полна крв нанесени на филтер хартија. Со оглед на тоа што примарниот хипотироидзам има најмалку 10-пати поголема преваленца од централниот хипотироидзам, а само 19% од случаите со централен хипотироидзам имаат пониска вредност на Т4, (66) одредувањето на вредноста на ТSH е поцелисходно и воглавно прифатено во светот.

Во 2014 година Европското Здружение за Педијатриска Ендокринологија (ESPE) во име на сите педијатриски ендокринолошки здруженија во светот издаде обновен водич за скрининг, дијагноза и водење на пациенти со конгенитален хипотироидзам. (67) Според упатството на ESPE одредувањето на концентрацијата на ТSH претставува најсензитивен тест за детектирање на примарен КХ кој е поефикасен отколку скрининг со одредување на Т4. (67)

Поради неонаталниот пик на ТSH и динамичните промени на тироидните хормони кои се случуваат во првите постнатални денови се постави прашањето која е оптималната возраст на земање примерок за скринингот кај новороденчињата. Со трендот на побрзо

испишување на новороденчињата од родилиште се зголемил и бројот на лажно позитивни наоди, поради што е неопходно вредностите на TSH на скрининг да се интерпретираат во корелација со времето кога се земени. Сепак, најдобро време за земање крв за тироиден скрининг е помеѓу 48 и 72 часа од раѓањето.

Друго и сеуште актуелно прашање во врска со тироидниот скрининг е границата на значајна TSH елевација односно, TSH cut-off вредноста, која варира од 6 до 20 mIU/L во различни центри. Во изминативе години во многу земји беа прифатени пониски cut-off вредности на TSH, што резултираше со зголемување на инциденцата на конгенитален хипотироидизам и особено детектирање на умерените КХ случаи со еутопична –“in situ” тироидна жлезда. Ford и LaFranchi во 2014 известуваат дека намалувањето на TSH cut-off вредноста од 20-25 mIU/L на 6-10 mIU/L скоро двојно ја зголеми инциденцата на КХ. (68) Во студија од Италија било најдено дека 21.6% од децата со перманентен КХ имале вредност на TSH на скрининг помала од 15 mIU/L, при што она што е важно во оваа студија е дека вредноста на TSH на скрининг не била дискриминаторен фактор меѓу транзиторните и перманентни форми на КХ. (69)

Неонаталниот скрининг во Република Македонија е воведен во 2002 година, најпрво како пилот проект во пет поголеми породилишта (2002-2006), а од 2007 година е задолжителен во целата држава.

### ***1.7.1 Евалуација на новороденче со позитивен неонатален скрининг***

Позитивниот скрининг тест за КХ претставува само почеток на еден дијагностички процес со кој би требало да се потврди дијагнозата, да се утврди етиологијата, воспостави оптималниот третман и следи понатамошниот исход. Податоците од фамилијарната историја треба да бидат насочени кон добивање на податок за консангвинитет, со што се зголемува веројатноста за дисхормоногенеза и податок за фамилијарна форма на КХ дури и кај подалечни роднини. (31) Податокот за стекнати тироидни болести во фамилијата вообичаено е ирелевантен со оглед на нивната честа преваленца во популацијата, но значаен е податокот за автоимуна тироидна болест кај мајката или пак консумација на

суплементи богати со јод. (70) Личната анамнеза треба да ги опфати податоците за родилната тежина и гестациска старост и евентуелен податок од мајката за хипотонија или послабо хранење на новороденчето. Со клинички преглед може да се утврди постоење на широко отворени фонтанели, жолтица, макроглосија, сува кожа и умбиликална хернија. Сепак овие клинички знаци кои укажуваат на КХ се присутни само кај 1-4% од новороденчињата, а многу често дури и гушавоста тешко клинички се детектира и е видлива единствено со имиџинг техниките. Клиничкиот преглед секако треба да биде фокусиран и на постоење на дизморфички карактеристики или срцев шум. (71)

Дијагнозата на КХ се поставува со биохемиска потврда на скрининг тестот, односно одредување на серумските вредности на TSH и T4/fT4. Доколку вредноста на T4/fT4 е пониска од референтната за соодветната возраст третманот треба да се отпочне веднаш. Според препораките на ESPE со третман се започнува и кога TSH >20 mIU/L, дури и ако вредноста на T4/fT4 е во граници на нормала. Кога пак вредноста на серумскиот TSH е помеѓу 6 и 20 mIU/L, а вредноста на T4/fT4 во нормални граници кај терминско општо добро новороденче на возраст до 21 ден се препорачува 1) понатамошни иследувања, вклучително имиџинг иследувања и обид за воспоставување на дефинитивна дијагноза или 2) разгледување на две опции во договор со семејството: а) отпочнување со третман веднаш, а потоа ретестирање без терапија во тек на понатамошното следење или б) одложување на третманот и повторни лабораториски анализи по 2 недели. (67)

### **1.7.2 Имиџинг иследувања**

Имиџинг иследувања кои овозможуваат визуелизација на тиродината жлезда се ултрасонографијата и радионуклеидната сцинтиграфија, и двете се од значење за детерминирање на етиологијата на КХ.

Тироидната сцинтиграфија овозможува приказ на тироидната жлезда, односно нејзино присуство или отсуство, нејзината позиција (при ектопична жлезда – на било кое место од foramen caecum на базата на јазикот до предниот медиастинум) и груба проценка за анатомската структура. Сцинтиграфијата може да се изведе во неонатална возраст кога

концентрацијата на TSH е сеуште висока, во тешки случаи дури и во период од 7 дена од почнувањето на терапијата со левотироксин, односно се додека вредноста на TSH е над 30 mIU/l.(7) Сцинтиграфијата може да се изведе или со 10-20 MBq технециум<sup>99m</sup> пертехнетат (<sup>99m</sup>Tc) или со 1-2 MBq јод<sup>-123</sup> (<sup>I</sup>123). Сцинтиграфијата со технециум е широко застапена, достапна во секојдневната пракса, поевтина и побрза, односно овозможува тироиден имицинг за 20-тина минути. Сцинтиграфијата со <sup>I</sup>123 доколку е достапна има поголема сензитивност бидејќи јодот за разлика од технециумот може да се органифицира, и со тоа да се овозможи квантитативен приказ на акумулацијата на радиотрасерот и изведување на тестови докажување дефекти во јодниот транспорт или абнормалности на тироидната оксидација. Тестот со перхлоратно отпуштање укажува на органификациски дефект доколку имаме процент на отпуштање >10% од администрираната доза на <sup>I</sup>123 кај нормално позиционирана тироидна жлезда (по апликација на перхлорат по 2 часа). (72,73)

Тироидната ултрасонографија е валидна имицинг метода за дефинирање на големината и тироидната морфологија кај пациентите со еутопична тироидна жлезда, но со неа не може да се детектираат ектопичните жлезди. Тироидната ултрасонографија се спроведува со високо фреквентна линеарна сонда (10-15MHz) која овозможува резолуција од 0.7 до 1 mm. Диференцирање помеѓу тироидна хипоплазија или диспластично нетироидно ткиво кај едно новородече бара огромно ултрасонографско искуство, поради што при ре-евалуација во подоцна возраст наодот може да се разликува од иницијалниот. (74). Со комбинирање на сцинтиграфијата и тироидната ултрасонографија се подобрува дијагностичката прецизност за етиологијата на конгениталниот хипотироидизам, и претставува водич за понатамошни иследувања, како молекуларно-генетски студии кои се разликуваат кај различните подтипови на конгенитален хипотироидизам.

**Она што е најважно да се забележи е дека реализирањето на имицинг испитувањата во ниеден случај не смее да го одложи отпочнувањето на терапијата и истото може да се одложи за подоцна, односно кога ќе се прави ре-евалуација на 3 годишна возраст.**

## 1.8 Терапија и следење

Според препораките на ESPE, орална терапија со левотироксин (L-T<sub>4</sub>) е единствениот препорачан третман кај пациентите со КХ кој треба да се отпочне што е можно поскоро, односно во првите две недели од животот или веднаш после добивањето на потврдните серумските анализи. Иницијална доза од 10-15 µg/kg/ден се препорачува вообичаено, со тоа што повисока доза на левотироксин е индицирана кај потешките форми на КХ, а пониска кај благите и умерени форми. (67) Целта на терапијата е да се нормализира T<sub>4</sub> што поскоро, да се избегне појава на хипертироидизам и да се овозможи нормален раст и развој. Со иницијална доза од 10-15 µg/kg кај најголем број од новороденчињата вредноста на TSH се нормализира во тек на првиот месец од почнувањето на терапијата. Понатамошно титрирање на дозата на левотироксинот се прави во согласност со клиничката слика и резултатите од тироидната функција и често е потребно мало зголемување или намалување на дозата.

Вредноста на TSH треба да се одржува во рамките на референтните вредности за возраста, додека вредноста на T<sub>4</sub> и FT<sub>4</sub> во горната половина од нормалните вредности за возраста. Првата контрола на тироидната функција треба да се направи по 1-2 недели од почнување со третманот со LT<sub>4</sub> и да се контролира на секој 2 недели се до целосно нормализирање на вредностите на TSH. Се препорачуваат контроли на тироидната функција на секој 1-3 месеци во тек на првата година од животот, односно на секои 2-4 месеци од 1 до 3 годишна возраст. Потоа контролите се поретки, вообичаено два до три пати годишно се до завршување на растот. Почести контроли се индицирани при наод на отстапувања на вредностите на тироидните тестови. (67)

## **1.9 Дијагностичка ре-евалуација и прекин на терапијата**

Кај децата со хипотироидизам каде што етиолошката дијагноза не е поставена на раѓање може да се направи дијагностичка ре-евалуација со прекин на терапијата на возраст поголема од 3 години кога најголемиот дел од тироксин зависната матурација е завршена, според студиите на магнетна резонанца на мозокот. (73) Целта на овој тест со прекин на терапија е идентификување на транзиторните форми помеѓу случаите на КХ, а со тоа избегнување на непотребен доживотен третман. Ре-евалуацијата се препорачува во сите случаи каде дијагностичките испитувања не се целосно завршени, кај пациентите со еутопична жлезда со или без гушавост, доколку третманот е започнат кај едно болно или прематурно новороденче, кај децата кои немале потреба од значително зголемување на дозата на LT4 во текот на првата година. За прецизна дијагностика потребно е третманот со левотироксин да се прекине во времетраење од 4-6 недели, а потоа да се направат биохемиски и имицинг испитувања. (67)

## **2. МОТИВ**

---

1. Етиолошката класификација на конгениталниот хипотироидизам откриен на неонатален скрининг е значајна и истата е предвидена во современите упатства за водење на пациентите со конгенитален хипотироидизам. По воведувањето на тироидниот скрининг и стекнување на рутинско искуство со истиот, во нашата држава беше неопходна студија со акцент на етиолошката класификација на нарушувањата на тироидната жлезда, со што ќе се добијат јасни податоци за застапеноста на тироидните дизгенези – атиреози, ектопии, хемитиреози, хипоплазии и тироидните дисхормоногенези како етиолошки причини на конгениталниот хипотироидизам.

Точната етиолошка класификација на КХ претставува овозможува адекватно клиничко водење на пациентите, и е водич за понатмошни испитувања како молекуларно-генетските студии кои се разликуваат кај различните подтипови на конгенитален хипотироидизам.

2. Голем број на студии во литературата од поново време известуваат дека одреден процент од децата со КХ откриени на скрининг имаат транзиторен хипотироидизам и кај нив постои можност за прекин на терапијата по 3 годишна возраст.(76-79) Недефинирањето на оваа група на пациенти со транзиторен хипотироидизам води кон непотребно спроведување на доживотна терапија. Ре-евалуацијата на КХ е предвидена и во современите водичи за конгенитален хипотироидизам и тоа кај сите деца над 3 годишна возраст каде што нема направено етиолошка дијагноза во доенчката возраст.

### 3. ЦЕЛИ

---

1. Да се одреди етиологијата на конгениталниот хипотироидизам откриен на неонатален скрининг и застапеноста на тироидни дизгенези (атиреози, ектопии, хипоплазии, хемитиреози) и тироидни дисхормоногенези
2. Да се одреди дефинитивната дијагноза на КХ: 1) перманентен хипотироидизам; 2) транзиторен хипотироидизам; 3) субклинички хипотироидизам и потребата од спроведување на трајна терапија
3. Да се анализираат разликите меѓу перманентниот, транзиторниот и субклиничкиот хипотироидизам
4. Да се идентификуваат индикатори од анализираните параметри кои би можеле да имаат рана предиктивна вредност за појава на транзиторен хипотироидизам
5. Изведување на молекуларно-генетски анализи кај пациентите со еутопична тироидна жлезда за присуство на мутации во гените асоцирани со тироидна дисхормоногенеза и *TSHR* генот и нивна корелација со фенотипот на КХ

### 4. ХИПОТЕЗИ

---

- Постојат пациенти со конгенитален хипотироидизам откриен на скрининг во неонаталната возраст кои нема да имаат перзистентен хипотироидизам и трајна потреба од терапија
- Постојат прогностички фактори со кои би можела да се предвиди дијагнозата на перзистентен или транзиторен хипотироидизам и потребата од долгорочна терапија

---

## **5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ**

---

### **5.1 Пациенти**

Во оваа интервенциона, лонгитудинална, ретроспективно-проспективна студија беа вклучени 127 деца со конгенитален хипотироидизам откриени на неонатален скрининг од неговото воведување во Р.Македонија во април 2002 год. до декември 2015 година и кои по дијагностицирањето редовно амбулантски беа следени во консултативно-ендокринолошката амбуланта на Универзитетската Клиника за детски болести.

Неонаталниот скрининг се базираше на одредување на тиростимулирачкиот хормон (TSH) со флуороимунометриска анализа (DELFLIA assay, neonatal TSH, LKB) на полна капка крв, земена од петата на новороденчето во период од 48 – 72 часа по раѓањето и нанесена на филтер хартија (Schleicher and Schuell Inc., Keene, NH, USA, Whatman 903).

TSH cut-off вредноста изнесуваше 15 mIU/l во периодот од 2002 - 2010 година, а 10mIU/l после 2010 година. Скринингот кај предвемно родените или тешко болни новороденчиња трансферирани во единици за интензивна нега и терапија беше реализиран во периодот помеѓу 1-вата и 2-та недела по раѓањето. На скрининг картичката задолжително се запишуваа родилните параметри (родилна тежина и гестациска старост) и времето кога е земен примерокот (постнатални денови), поради адекватна интерпретација на резултатот.

Вредностите на TSH помеѓу 10 и 15mIU/L беа сметани за гранични и беше направена повторна анализа (нова скрининг картичка), вообичаено после една недела од претходната анализа. Доколку на повторната анализа вредноста на TSH изнесуваше над 10 mIU/L пациентите беа повикувани за венски анализи.

Дијагнозата на конгенитален хипотироидизам кај новороденчињата беше поставена со вредности на серумскиот TSH >10 mIU/L, без оглед на вредностите на вкупен/слободен T4 (ниски или нормални).

Врз основа на погоре изнесеното јасно беа дефинирани критериумите за вклучување и исклучување во нашата студија и тоа:

### **5.1.1 Критериуми за вклучување во студијата:**

- Деца со конгенитален хипотироидизам откриени на неонатален скрининг, т.е. дијагноза поставена во неонатална возраст (<28 дена) со вредност на серумскиот TSH >10 mIU/L, кои се на редовна терапија со левотироксин
- Деца со умерено покачени вредности на TSH на неонатален скрининг, асоцирани со нормални вредности на T4, кои во одреден период до 3 годишна возраст примале терапија со левотироксин
- Деца кои имале ултрасонографски преглед барем еднаш во текот на првата година од животот
- Деца на возраст од најмалку 36 месеци за ре-евалуација со прекин на терапијата

### **5.1.2 Критериуми за исклучување од студијата:**

- Доенчиња со тироидни нарушувања кои не се откриени на неонатален скрининг
- Синдромски форми на конгенитален хипотироидизам
- Секундарен или терциерен хипотироидизам

## **5.2 Дизајн на студијата**

По потврдување на дијагнозата кај сите пациенти беше отпочната терапија со левотироксин во доза од 10-15 µg/kg. Следењето на пациентите со КХ се одвиваше во склад со современите водичи и опфаќаше периодично мониторирање на тироидната функција и тоа: 1) на секои две недели до нормализирање на вредностите на TSH; 2) на секој 1 до 3 месеци во тек на првата година од животот; 3) на секои 2-4 месеци до 3 годишна возраст; 4) на секои 6-12 месеци потоа. (65) Целта на тироидното мониторирање беше одржување на еутиреотична состојба, поточно одржување на вредноста на TSH во рамките на референтните вредности за возраста (со тенденција кон долната граница

<3mIU/L), но не помалку од 0.05 mIU/L и вредностите T4/fT4 во горната половина од референтните вредности. При отстапувања беше титрирана дозата на левотироксинската терапија и закажувана контрола за 1 месец. Освен тироидниот мониторинг редовното следење на децата опфаќаше контрола на нивниот раст и невролошки развој.

Кај децата со КХ постари од 3 години беше направен тест со прекин на левотироксинската терапија во период од 4-6 недели, по што следеше дијагностичка ре-евалуација. На родителите им беше дадено детално усно и писмено објаснување со препораки за внимателно следење на евентуална појава на некој од клиничките знаци на хипотироидизам. Ре-евалуацијата опфаќаше анализа на тироидната функција со одредување на вредностите на TSH, T4/fT4 и имиџинг иследувања, односно тироидна ултрасонографија и тироидна скинтиграфија.

### **5.2.1. Класификација во групи**

Врз основа на анализите за тироидната функција по прекин на терапијата, пациентите беа класифицирани во три групи:

- Група 1 - **перманентен хипотироидизам**; пациенти со пораст на TSH >10 mIU/l, кај кои повторно беше воведена терапијата со левотироксин, во доза како пред ре-евалуацијата и титрирана во текот на понатамошното следење
- Група 2 – **транзиторен хипотироидизам**; дефиниран како нормална тироидна функција со вредности на TSH < 5 mIU/l при ре-евалуацијата и после најмалку 6 месеци период на следење (т.е. пациенти кои немаат потреба од понатамошна терапија)
- Група 3 – **умерена хипертиреотропинемија или субклинички хипотироидизам**; дефиниран со умерена елевација на TSH (5-10 mIU/l). Кај овие пациенти беа правени контроли на тироидните хормони во 3 месечни временски интервали, а терапијата беше прекината само кај оние пациенти кај кои во тек на следењето беа добиени 3 последователни вредности на TSH < 5 mIU/l. Останатите пациенти беа повторно поставени на ниска доза на левотироксинска терапија.

Кај пациентите кај кои терапијата беше прекината на возраст помеѓу 2 и 3 години во тек на редовното следење, поради постојано нормални вредности на тироидните тестови или пак малата доза на левотироксинска терапија, ре-евалуацијата опфаќаше повторна анализа на тироидната функција и ултрасонографија. Доколку вредностите беа во граници на нормала пациентите беа класифицирани како **транзиторен хипотироидизам** без потреба од понатамошно следење.

Врз основа на комбинација на наодот од ултразвучниот преглед и радиоизотопскиот скен беше направена етиолошка класификација на конгениталниот хипотироидизам на тироидни дизгенези и тироидни дисхормоногенези.

Пациентите со тироидна дизгенеза беа класифицирани во следните подгрупи:

- атиреоза (тироидна агенезија) - кога немаше визуелизација на тироидно ткиво при двете имиџинг техники (ултразвук и радиоизотопски скен)
- хипоплазија кога калкулираниот тироидниот волумен ќе изнесува помалку од 2SD од нормалните вредности за пол и возраст
- ектопија - кога со радиоизотопски скен ќе се докаже присутно тироидно ткиво надвор од нормалната тироидна претрахеална позиција

### **5.3 Лабораториски методи**

Вредностите на серумскиот TSH, T4, fT4 беа одредувани со IMMULITE 2000 chemiluminescent enzyme immunoassay – (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.). Вредностите во ранг од 3-ти до 97 перцентил за соодветната возраст беа сметани за нормални. (78)

Референтни вредности: T4: 4.5-10.9 µg/dL, FT4: 0.9-1.8 ng/dL, TSH 0.4-5.0 mIU/L.

### **5.4 Имиџинг иследувања**

#### **5.4.1 Тироидна ултрасонографија**

Ултрасонографскиот преглед на тироидната жлезда беше изведен од страна на ист истражувач-ехографер со ултразвучниот апарат - SonoScape SSI-5000 Color Doppler

Ultrasound System (SonoScape Medical Corp., Shenzhen, China), со цел одредување на присуство или отсуство на тироидната жлезда во тироидната ложа, нејзината големина и ехогена структура кај пациентите со „in situ“ жлезда. Големината на тироидната жлезда беше одредувана со лонгитудинални и трансферзални мерења, потоа калкулирање на волуменот на тироидните лобуси и нивна споредба со референтни мерки за пол и возраст од литература.(81,82,83) Волуменот на секој од тироидните лобуси беше одредуван со користење Вгрупп-овата формула:

$V \text{ (ml)} = 0.479 \times \text{должина (cm)} \times \text{ширина (cm)} \times \text{длабочина (cm)}$ , а волуменот на тироидната жлезда како збир од волумените на десниот и левиот лобус.

#### **5.4.2 Тироидна сцинтиграфија**

Тироидниот скен беше изведуван на Институтот за патофизиологија и нуклеарна медицина при Медицинскиот факултет во Скопје со технециум пертехнетат ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) со двоглава гама камера со pinhole-колиматор (Mediso Medical Imaging systems). Со тироидната сцинтиграфија беше овозможена визуелизација на тироидната жлезда и нејзината поставеност (нормална или ектопична позиција), големината на двата тироидни лобуси, хомогеноста или хетрогеноста на фиксација на радиотрасерот, присуство на нодули и нивна функционалност.

Фиксацијата над тироидната жлезда беше одредувана 20 минути по интравенска апликација на  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  (2MBq/kg) и тоа во стандардна антеро-постериорна позиција (АП) и латерални позиции (десно-латерална и лево-латерална), во положба при која пациентот лежи на грб со лесно зафрлена глава наназад. При снимањето беше поставуван маркер (обележувач) - извор на гама зраци рутински на југулум, а дополнително и во висина на брада, уста, нос или уво за прецизно одредување на положбата на тироидната жлезда во случаите на тироидни ектопии. По протокол беа правени три статички фотоскенови АП без зголемување (zoom), АП со zoom и АП со маркер на југулум.

## 5.5 Генетски анализи

Кај 22 пациенти со еутопична тироидна жлезда со перманентен, транзитoren или субклинички хипотироидизам беше направена генетска анализа со мултигенетско секвенционирање на кандидатските гени во истражувачка лабораторија при Универзитетот во Кембриџ, Велика Британија (University of Cambridge Metabolic Research Laboratories, Institute of Metabolic Science, Addenbrooke's Hospital, Cambridge UK). DNA беше изолирана од периферните леукоцити во генетската лабораторија при Универзитетската Клиника за детски болести, а потоа со Sanger секвенционирање беа секвенционирани гените асоцирани со тироидна дисхормоногенеза: *TPO*, *TG*, *DUOX2*, *DUOXA2*, *SLC26A4*, *SLC5A5*, *IYD* и *TSHR* генот. Сегрегациони анализи беа направени кај родителите во сите случаи со позитвни наоди.

### Sanger секвенционирање

Сите кодирачки егзони и интрон/егзон врски на релевантните гени беа амплифицирани од геномската DNA со полимераза верижна реакција (PCR) со користење на специфични прајмери, а составот на реакционата смеса и условите се наведени подолу:

Компоненти	X 1 (µL)
UP H <sub>2</sub> O	2.95
2X Premix J	5
10 µM Forward прајмер (концентрација. 0.5 µM)	0.5
10 µM Reverse прајмер (концентрација. 0.5 µM)	0.5
20 ng/µL DNA примерок	1
5 U/µL BioTaq (0.25 U за секои 10 µL реакција)	0.05
<b>Вкупен волумен</b>	<b>10</b>

### Програма на температурните циклуси:

Иницијална денатурација: 94°C - 4 мин

Денатурација: 94°C - 30 сек  
Хибридизација (anneal): 58°C - 30 сек } 35 циклуси

Полимеризација (extension): 72°C - 45 сек

Конечна екстензија: 72°C - 5 мин

10°C - задржување

PCR продуктите беа визуелизирани со електрофореза со користење на 1.5% агарозен гел, а потоа прочистени со користење на егзонуклеаза I (Exo I) и Shrimp Alkaline Phosphatase, кои овозможуваат отстранување на вишокот нуклеотиди и прајмерите од PCR реакцијата. PCR продуктите потоа беа секвенционирани со користење на BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) и 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Мутациите беа класифицирани како **патогени** доколку за истите постојат податоци во литература, или доколку е зафатена протеин кодирачката секвенца (аблација на транскрипцијата, стоп иницијација, губење на стоп кодонот, варијација во сплајсинг регионот, сплајсинг донор варијација, сплајсинг акцептор варијација, frameshift мутација, inframe инсерција, inframe делеција, варијација во иницијаторниот кодон и missense варијација), односно класифицирани како **веројатно патогени** со користење на SIFT или PolyPhen предиктивните програми доколку беше возможно, или пак варијантна алелна фреквенција <0.02 (minor allele frequency - MAF) во Exac базата. За нови мутации се сметаа оние кои не се присутни во Human Genome Mutation Database Professional (HGMD).

### Номенклатура

Варијациите беа опишани со користење на номенклатура одобрена од Human Genome Variation Society (HGVS; [www.hgvs.org/mutnomen](http://www.hgvs.org/mutnomen)). Нуклеотидното одбележување

се започнуваше со A(+1) на иницијалниот транслациски кодон на референтната секвенца според NCBI како што е наведено подолу: NM\_000547.5, NP\_000538.3 (*TPO*), NM\_003235.4, NP\_003226.4 (*TG*), NM\_014080.4, NP\_054799.4 (*DUOX2*), NM\_207581.3, NP\_997464.2 (*DUOXA2*), NM\_000441.1, NP\_000432.1 (*SLC26A4*), NM\_000453.2, NP\_000444.1, (*SLC5A5*), NM\_001318495.1, NP\_001305424.1 (*IYD*) и NM\_000369.2, NP\_000360.2 (*TSHR*).

## **5.6 Анализа на податоци**

При изработка на студијата беше формирана база на податоци со следните параметри:

- демографски карактеристики
- податоци од перинатална историја (родилна тежина, гестациска старост, начин на породување, асоцирани конгенитални малформации, перинатални проблеми)
- фамилијарна анамнеза за тироидни заболувања
- вредност на TSH на неонатален скрининг
- вредност на серумските TSH и T4 при поставување на дијагнозата
- иницијален ултразвучен преглед
- возраст на отпочнување на терапијата
- иницијална доза на левотироксин
- вредност на TSH по 1 месец од иницирање на терапија
- временски интервали на следење во првата година од животот
- доза на левотироксин на возраст од 1 година
- доза на левотироксин на возраст од 2 година
- доза на левотироксин на возраст од 3 година

- доза на левотироксин при ре-евалуација
- вредности на TSH, T4 при ре-евалуација
- ултразвучен преглед при ре-евалуација
- етиолошка дијагноза (ултразвук, тироиден скен)
- генетски наоди

Сите овие податоци беа компарирани меѓу групите како можни предиктивни фактори за појава на транзитoren конгенитален хипотироидизам.

---

## 6. СТАТИСТИЧКА ОБРАБОТКА НА ПОДАТОЦИТЕ

---

Статистичката обработка на податоците е изведена во статистичкиот програм SPSS for Windows 22.0. Притоа беа користени следните статистички методологии:

Анализата на категориските варијабли беше извршена преку таблица на контингенција; односно приказ преку фреквенцијата на испитаници (проценти на структура), а разликата во фреквенциите меѓу групите беше тестирана за сигнификантност преку вредноста од Chi-square тестот. ( $\chi^2$ )

Сите нумеричките варијабли пак најпрво беа тестирани за нормалност во дистрибуцијата на податоците со Shapiro-Wilksov-иот test, како и со пресметување на вредноста на z скорот на мерката за асиметрија (skeweness) и вредноста на z скорот на мерката за облик (kurtosis). Во одредени случаи, беше извршена и визуелната анализа на хистограмите со цел да се изведат соодветни заклучоци. Притоа, беше проценето апроксимативно нормална дистрибуција на вредностите доколку р вредноста од Shapiro-Wilk's тестот за нормалност е поголема од 0.05 и, добиените z вредностите се наоѓаат во распонот меѓу -1,96 до +1,96 (Doane и Seward, 2011). Резултатите од тестовите за нормалност на податоците се прикажани на Табела 4.

Варијаблите кои покажа апроксимативно нормална дистрибуција на нивните вредности, понатаму во оваа студија се прикажани како **просек  $\pm$  SD** и графички преку бар со столпчиња (**chart with error bar**). За споредба на сигнификантноста во разликите на просеците меѓу групите (**перманентен, транзиторен** и групата со **умерена хипертиреотропинемија или субклинички хипотироидизам**) беше користена One-Way ANOVA, проследена со Tukey-HSD Post-Hoc тестот.

Варијаблите пак кои покажаа сигнификантно отстапување на вредностите од нормалноста, се претставени преку нивната **медијана**, а како мерка за дисперзијата на вредностите беше земен **интеркварталниот ранг (IQR) на податоците и целокупниот ранг (минимум – максимум)**. Овие резултати се претставени преку **boxplot**, кадешто

централната линија соодветствува на медијаната, а кутијата на IQR. За споредба на централните тенденции меѓу групите беше користен непараметрискиот Kruskal-Wallis тест, проследен со последователни Mann-Whitney U-тестови притоа контролирајќи ја тип I грешката преку употреба на пристапот на Bonferroni.

За лонгитудиналните анализи (споредба на медијаните на истата варијабла во различни временски интервали, односно иницијално – при поставување на дијагнозата и, при ре-евалуацијата) беше искористен непараметрискиот Wilcoxon Signed Ranks тест за поврзани примероци.

За одредување на предиктивните независни фактори за транзитoren хипотиреоидизам, се користеше бинарна логистичка регресиона анализа, преку која се одреди односот на веројатност на изложеност (OR), како приближна вредност на вистинскиот ризик (RR). Статистичката прецизност на OR беше добиена преку пресметување на границите на доверба околу проценетите вредности - Confidence intervals (CI).

Cutoff вредностите беа пресметани преку анализа на Receiver operating characteristic (ROC) кривите.

Нивото на статистичка сигнификатност беше дефинирано со вредност на  $p < 0,05$  (означено во графициите со \*), односно за висока сигнификатност со вредност на  $p < 0,001$  (означено со\*\*).

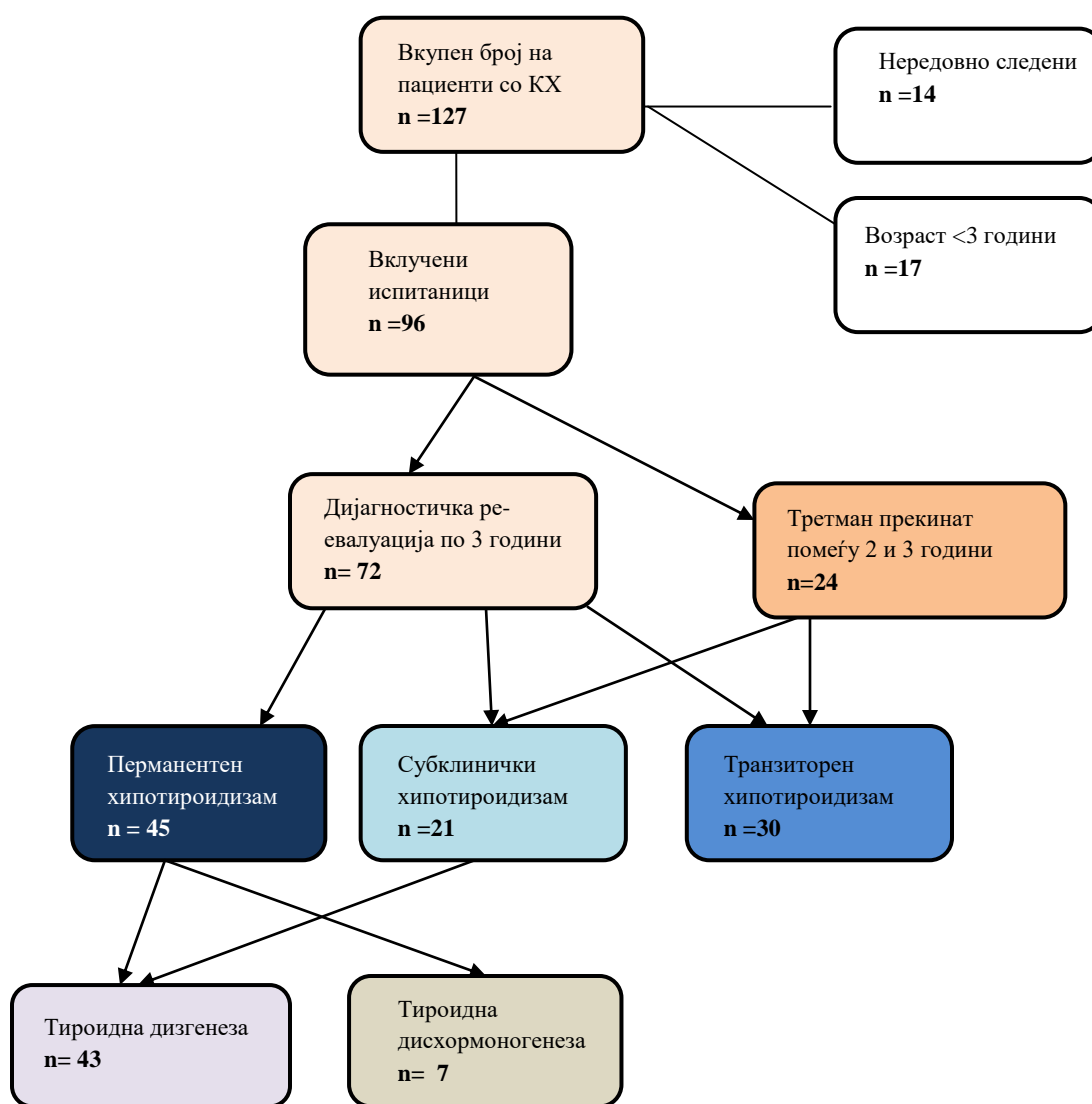
Добиените резултати се прикажани табеларно и графички.

Табела 4. Тестирање на нормалност на дистрибуција на податоците за испитуваните варијабли

Варијабли	z скор на мерката за асиметрија (skeweness)	z скор на мерката за облик (kurtosis)	Shapiro-Wilk-тест (p-вредност)	Финален суд околу дистрибуцијата
Родилна тежина (g)	0,344 (нормална)	0,541 (нормална)	0,491 (нормална)	<b>Нормална дистрибуција</b>
неоTSH скрининг (mIU/L)	2,534 (отстапување)	-0,706 (нормална)	0,000 (отстапување)	Отстапување од нормалноста
Нивоа на серумски Т4 (µg/dL)	0,069 (нормална)	-2,049 (отстапување)	0,003 (отстапување)	Отстапување од нормалноста
Возраст на почнување со терапија (денови)	2,737 (отстапување)	1,266 (нормална)	0,006 (отстапување)	Отстапување од нормалноста
Иницијална доза на Левотироксин (µg/ТТ)	0,506 (нормална)	-1,175 (нормална)	0,104 (нормална)	<b>Нормална дистрибуција</b>
Нивоа на TSH еден месец по терапија (mIU/L)	13,376 (отстапување)	37,302 (отстапување)	0,000 (отстапување)	Отстапување од нормалноста
Доза на Левотироксин на 1 год.возраст (µg/ТТ)	1,655 (нормална)	0,199 (нормална)	0,052 (нормална)	<b>Нормална дистрибуција</b>
Доза на Левотироксин на 2 год.возраст (µg/ТТ)	-1,624 (нормална)	-0,877 (нормална)	0,087 (нормална)	<b>Нормална дистрибуција</b>
Доза на Левотироксин на 3 год.возраст (µg/ТТ)	-1,854 (нормална)	1,977 (отстапување)	0,057 (нормална)	<b>Нормална дистрибуција</b>
Возраст при ре-евалуација (години)	2,596 (отстапување)	0,210 (нормална)	0,002 (отстапување)	Отстапување од нормалноста
Доза на Левотироксин при ре-евалуација (µg/ТТ)	1,332 (нормална)	0,000064 (нормална)	0,342 (нормална)	<b>Нормална дистрибуција</b>
Нивоа на серумски Т4 (µg/dL) при ре-евалуација	1,503 (нормална)	-2,267 (отстапување)	0,000 (отстапување)	Отстапување од нормалноста

## 7. РЕЗУЛТАТИ

Во испитуваниот период од воведувањето на тироидниот скрининг (април 2002 год.) до декември 2015 год. беа скринирани вкупно 251.008 новороденчиња, со просечна покриеност од 96,72%. Примарен конгенитален хипотироидизам беше дијагностициран кај 127 новороденчиња, со вкупна преваленца од 1/1976. На слика 8 е претставен дијаграмот на студијата и испитуваната популација на пациенти со КХ.



Слика 8. Дијаграм за текот на студијата и опис на испитуваната популација

Базичните демографски, клинички и биохемиски параметри на пациентите со конгенитален хипотироидизам кои беа вклучени во студијата од нивното дијагностицирање па се до ре-евалуацијата се прикажани во табелите 5, 6, 7 и 8.

Студијата вклучува речиси еднаква застапеност на машки и женски пациенти со конгенитален хипотироидизам и тоа преодоминантно термински новороденчиња, со нормална родилна тежина и Апгар скор, кои имале уреден перинатален тек. Најголем дел од испитаниците негираа постоење на тироидни болести кај други членови во семејството. (Табела 5)

Табела 5. Демографски карактеристики и податоци од перинаталната историја

Карактеристики	Вредност
Пол Машки Женски	45,3% 54,7%
Родилна тежина (g)	3347 ± 405
Начин на породување спонтано со царски рез	70,5% 29,5%
Апгар нормален лесна перинатална асфиксија	76,8% 23,2%
Перинатална историја Жолтица Инфекции Конгенитални малформации	29,5% 6,3% 4,2%
Фамилијарна анамнеза за тироидни болести	11,8%

Карактеристиките на новороденчињата со КХ, односно биохемиските и имицинг карактеристики при поставување на дијагнозата се претставени во Табела 6.

Табела 6. Биохемиски карактеристики на конгениталниот хипотироидизам при поставување на дијагнозата

Карактеристики	Вредност
TSH вредност на неонатален скрининг (неоTSH) (mIU/L)	22,05 (IQR = 67,5; ранг 7,7 -220)
Групирање според вредностите на TSH на скрининг	
неоTSH < 40 mIU/L	56,8%
неоTSH > 40 mIU/L	43,2%
Нивоа на серумски TSH	
< 20 mIU/L	36,8%
> 20 mIU/L	63,2%
Нивоа на серумски T4 ( $\mu\text{g/dL}$ )	8,1 (IQR = 7,1; ранг 0,4 – 16,5)
Возраст на почнување со терапија (денови)	14 (IQR = 7; ранг 5 - 25)
Иницијална доза на Левотироксин ( $\mu\text{g/kg}$ )	10,08 $\pm$ 2,49
Ехо на тироидна жлезда во неонатална возраст	
нормална големина и ехогеност	43,2%
атиреоза	30,5%
хипопластична жлезда	15,8%
хиперпластична жлезда	9,5%

Врз основа на вредноста на TSH на неонаталниот скрининг, постоеше речиси идентична фреквенција на пациентите со тежок (>40 mIU/L) и умерен (<40 mIU/L) хипотироидизам. Вредноста на TSH од 40mIU/l беше земена согласно водичот за скрининг, дијагноза и менаџмент на КХ издаден од Европското здружение за педијатриска ендокринологија (ESPE), при што се препорачува иницирање на терапија веднаш во сите случаи со вредност на капиларниот TSH над 40mIU/L, без потреба од чекање на резултатот на серумските анализи. Вредностите пак на серумскиот TSH беа преобладавајќи >20 mIU/L, асоцирани со пониски вредности на тоталниот тироксин (T4). Левотироксинската терапија кај нашите испитувани пациенти беше воведена во првите две недели постнатална возраст (медијана 14, IQR=7), во доза 10,08  $\pm$  2,49  $\mu\text{g/TT}$  што е согласно со препораките од ESPE. Во однос на иницијалните ултрасонографски наоди на тироидната жлезда реализирани во

неонатална возраст, доминантно беа застапени пациенти со присутна тироидна жлезда на еутопичната позиција, со нормална големина за возраста и ехогеност, а потоа следеа пациентите кај кои не беше визуелизирано ткиво во тироидната ложа и иницијално беа проценети како тироидна агенезија.

Карактеристиките на хипотироидизмот во тек на следењето на пациентите се претставени во Табела 7.

Табела 7. Карактеристики во тек на следењето на пациентите со конгенитален хипотироидизам

Карактеристики	Вредност
Нивоа на TSH на возраст од 1 месец (mIU/L)	2,49 (IQR = 5,28)
Групирање според TSH на возраст од 1 месец (mIU/L)	
TSH < 5 mIU/L	65,3%
TSH > 5 mIU/L	29,5%
Нема податок	5,3%
Интервали на следење во 1-вата година	
3 месеци	57,9%
помалку од 3 месеци	42,1%
Доза на Левотироксин на 1-ва год. ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$3,16 \pm 0,83$
Доза на Левотироксин на 2-ра год. ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$2,63 \pm 1,02$
Доза на Левотироксин на 3-та год. ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$2,66 \pm 0,99$
Психомоторен развој со психолошко тестирање	
Уреден	97,9%
Блага когнитивна дисфункција	2,1%

По воведување на терапијата со левотироксин кај најголем дел од пациентите беше постигната еутиротична состојба, што може да се види преку вредноста на TSH (намалување на медијаната од 22,05 mIU/L на 2,49 mIU/L) одредена 1 месец по отпочнувањето со терапија. (Табела 7). Пациентите преодоминантно беа следени во три

месечни интервали во тек на првата година од животот, но сепак кај 42% од случаите беше индицирано почесто следење, односно месечни контроли во тек на првата година. Кај најголем број од пациентите беше постигнат нормален раст и психомоторен развој.

Карактеристиките на пациентите со КХ за време на дијагностичката ре-евалуација се прикажани во табела 8.

Табела 8. Карактеристики на хипотироидизмот при дијагностичката ре-евалуација

<b>Карактеристики</b>	<b>Вредност</b>
Возраст при ре-евалуација (години)	4,5 (IQR = 4,0; ранг 1,8 – 14)
Доза на Левотироксин при ре-евалуација ( $\mu\text{g}/\text{TT}$ )	2,17 $\pm$ 0,92
Нивоа на серумски TSH при ре-евалуација < 20 mIU/L > 20 mIU/L	52,6% 47,4%
Нивоа на серумски T4 ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ ) при ре-евалуација	7,43 (IQR = 8,8; ранг 1,0-16,2)
Тироиден скен при ре-евалуација атиреоза ектопија хипопластична жлезда хиперпластична жлезда (тироидна дисхормоногенеза) уреден наод	37,6% 21,3% 11,5% 6,6% 23,0%
Ехо при ре-евалуација нормална големина и ехогеност атиреоза хипопластична жлезда хиперпластична жлезда	45,3% 37,9% 9,5% 7,4%
Дијагноза Перманентен хипотироидизам Транзитoren хипотироидизам Субклинички хипотироидизам	48,4% 30,5% 21,1%

Дијагностичката ре-евалуација беше направена на средна возраст од 4,5 години. Сите пациенти беа во еутиреоитична состојба при евалуацијата. Ре-евалуацијата беше направена по прекин на терапија во среден период од 30 дена. Перманентниот хипотироидизам беше доминантен тип на хипотироидизам, застапен во 48,4%, додека транзиторниот хипотироидизам беше присутен кај 30,5% случаи. Перманентниот хипотироидизам врз основа на сцинтиграфскиот и ултрасонографскиот во најголем процент беше резултат на тироидна дизгенеза, и тоа атиреоза или ектопија, а во помал процент резултат на тироидна хипоплазија или тироидна дисхормоногенеза.

### **7.1 Компарација на испитуваните параметри помеѓу пациентите со перманентен, транзиторен и субклинички хипотироидизам**

Разликите во демографските и клинички карактеристики меѓу трите дијагностички групи се претставени на следната табела (Табела 9).

Од дадениот приказ се забележува дека не постои сигнификантна разлика во родилната тежина, гестациската старост, начинот на породување, апгар скорот, фамилијарната анамнеза и возраста на отпочнување со терапија меѓу пациентите со перманентен, транзиторен и субклинички хипотироидизам. Сигнификантна разлика постоеше единствено во фреквенцијата на машки и женски испитаници, односно перманентниот хипотироидизам беше сигнификантно позастапен кај женските индивидуи, додека пак субклиничкиот хипотироидизам беше сигнификантно позастапен кај машките индивидуи.

*Табела 9. Базични демографски и клинички параметри меѓу испитаниците со перманентен, транзиторен и субклинички хипотироидизам*

<b>Параметри</b>	<b>Перманентен хипотироид.</b>	<b>Транзиторен хипотироид.</b>	<b>Субклинички хипотироид.</b>	<b>Сигнификантност</b>
Пол				
женски индивидуи	69,60%	44,80%	35,00%	$\chi^2 = 8,376$ $p = 0,015$
машки индивидуи	30,40%	55,20%	65,00%	
Родилна тежина (g)	3392 ± 339	3311 ± 461	3294 ± 331	F = 0,563 p = 0,571 (n.s.)
Гестациска старост				
< 37 гестациски недели	4,30%	6,90%	0,00%	$\chi^2 = 1,400$ p = 0,497 (n.s.)
> 37 гестациски недели	95,70%	93,10%	100,00%	
Апгар				
лесна перинат. асфиксија	28,90%	20,70%	10,00%	$\chi^2 = 2,913$ p = 0,233 (n.s.)
нормален	71,10%	79,30%	90,00%	
Начин на породување				
спонтано	68,90%	69,00%	80,00%	$\chi^2 = 3,131$ p = 0,536 (n.s.)
со царски рез	31,10%	31,00%	20,00%	
Фамилијарна анамнеза				
присутна	13,0%	6,9%	15,0%	$\chi^2 = 0,946$ p = 0,623 (n.s.)
отсутна	87,0%	93,1%	85,0%	
Возраст на почнување со терапија (денови)	12 (IQR = 7)	15 (IQR = 9)	14 (IQR = 7)	F = 5,921 p = 0,052 (n.s.)

### **7.1.1 Споредба на вредностите на TSH на неонатален скрининг (neoTSH) и серумскиот TSH меѓу пациентите со перманентен, транзиторен и субклинички хипотироидизам**

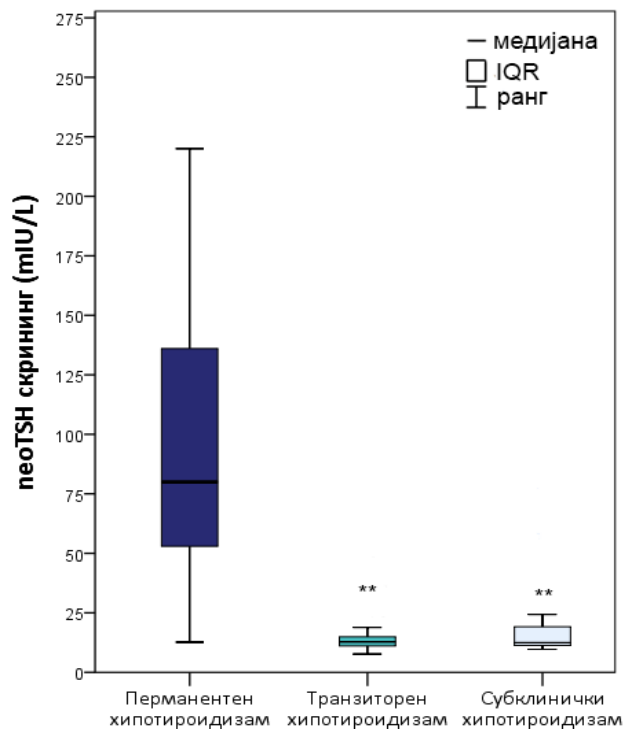
Вредностите на TSH на неонаталниот скрининг и серумскиот TSH меѓу трите дијагностички групи се претставени на Табела 10.

Табела 10. Споредба на вредностите за неоTSH (mIU/L) и серумскиот TSH меѓу испитаниците со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам

Параметри	Перманентен хипотироид.	Транзитoren хипотироид.	Субклинички хипотироид.	Сигнификантност
неоTSH скрининг (mIU/L)	80,0 (IQR = 89,4; ранг 12,7 – 220,0)	12,8 (IQR = 5,1; ранг 7,7 – 45,0)	12,5 (IQR = 8,4; ранг 9,7 – 76,7)	<b>F = 57,704</b> <b>p = 2,95·10<sup>-13</sup>(**)</b>
Групи според вредноста на неоTSH скрининг				
< 40 mIU/L	17,39%	96,55%	90%	<b>χ<sup>2</sup> = 56,788</b> <b>p = 4,66·10<sup>-13</sup>(**)</b>
> 40 mIU/L	82,61%	3,45%	10%	
Нивоа на серумски TSH				
< 20 mIU/L	0%	75,86%	65%	<b>χ<sup>2</sup> = 52,624</b> <b>p = 3,74·10<sup>-12</sup>(**)</b>
> 20 mIU/L	100%	24,14%	35%	

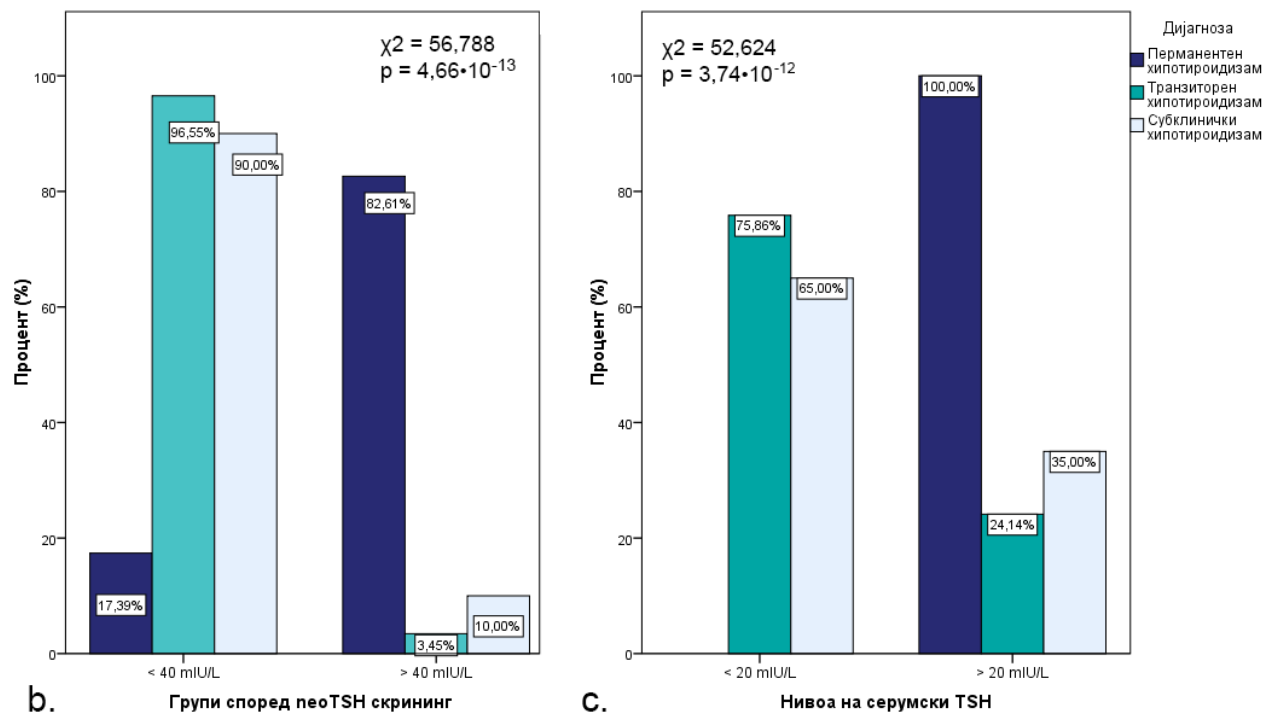
\*\*p<0,001

Најпрво со примена на Kruskal-Wallis тестот се покажа дека постојат статистички високо сигнификантни разлики во вредностите за неонаталниот TSH на скрининг меѓу испитаниците од трите групи ( $p = 2,95 \cdot 10^{-13}$ ). Последователните Mann-Whitney тестови потврдија дека пациентите со перманентен хипотироидизам имаат сигнификантно повисоки вредности на TSH на неонатален скрининг во однос на оние со транзитoren ( $U = 48,5$ ;  $p = 2,2 \cdot 10^{-11}$ ) и субклинички хипотироидизам ( $U = 52,0$ ;  $p = 1,5 \cdot 10^{-8}$ ). По групирање на пациентите според тежината на хипотироидизмот се покажа сигнификантно повисока фреквенција на пациенти со вредности на TSH на скрининг  $>40$  mIU/L кај перманентниот хипотироидизам, во однос на останатите групи ( $p = 4,66 \cdot 10^{-13}$ ). Графичкиот приказ на разликите на TSH вредностите на неонатален скрининг и серумскиот TSH помеѓу испитуваните групи е претставен на слика 9а и 9б. Нивоата на серумскиот TSH при поставување на дијагнозата на КХ покажа сигнификантно повисока фреквенција на испитаници со вредности на серумскиот TSH повисоки од 20 mIU/L кај перманентниот хипотироидизам, во однос на останатите групи. (Слика 9 с).



а. неоTSH скрининг

Слика 9а. Кај пациентите со перманентен хипотироидизам вредноста на TSH на неонатален скрининг е статистички сигнификантно повисока (\*\* $p < 0,001$ ) отколку кај пациентите со транзиторна и субклиничка форма на хипотироидизам. Вредностите пак на TSH на скрининг не се разликуваат сигнификантно помеѓу пациентите со транзиторен и субклинички хипотироидизам.



Слика 9б. Постои сигнификантно повисока фреквенција на испитаници со вредности повисоки од 40 mIU/L при неонаталниот скрининг кај перманентниот хипотироидизам, во однос на останатите групи. Слика 9с. Постои сигнификантно повисока фреквенција на испитаници со вредности повисоки од 20 mIU/L на серумскиот TSH кај перманентниот хипотироидизам, во однос на останатите групи.

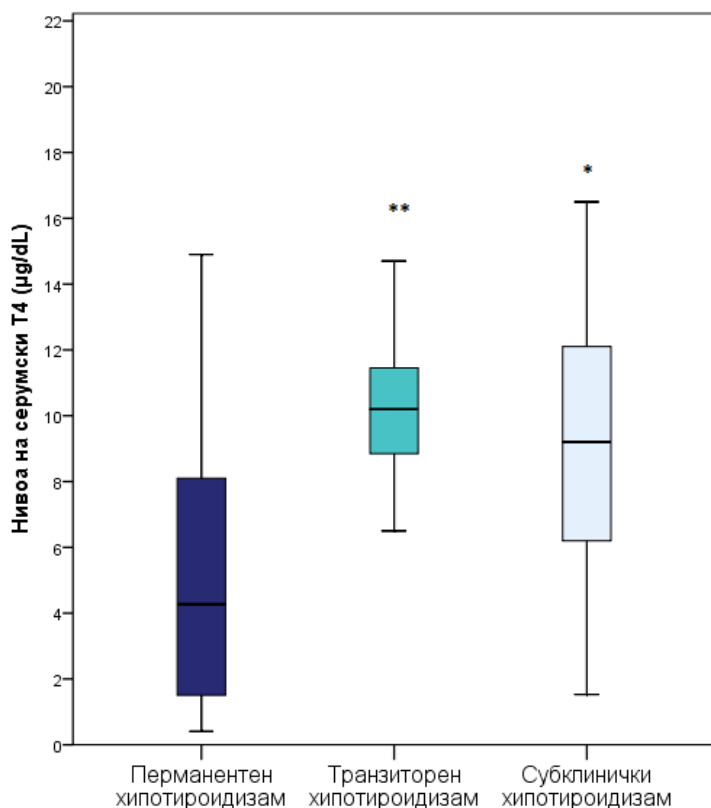
### 7.1.2 Споредба на вредностите на серумскиот тотален тироксин (T4) меѓу испитаниците со перманентен, транзиторен и субклинички хипотироидизам

Со Kruskal-Wallis тестот се покажа дека постојат статистички високо сигнификантни разлики во медијаните на серумскиот T4 меѓу испитаниците од трите групи ( $p = 0,000001$ ). Последователните Mann-Whitney тестови потврдија дека испитаниците со перманентен хипотироидизам имаат сигнификантно пониски вредности на серумски T4 во однос на испитаниците со транзиторен ( $U = 151,0$ ;  $p = 0,000001$ ) и субклинички хипотироидизам ( $U = 181,0$ ;  $p = 0,001$ ). Резултатите се прикажани на табела 11 и слика 10.

Табела 11. Споредба на нивоата на серумски Т4 ( $\mu\text{g/dL}$ ) меѓу испитаниците со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам

Параметри	Перманентен хипотироид.	Транзитoren хипотироид.	Субклинички хипотироид.	Сигнификантност
Нивоа на серумски Т4 ( $\mu\text{g/dL}$ )	4,27 (IQR = 6,7; ранг 0,4 – 14,9)	10,22 (IQR = 2,9; ранг 6,5 – 14,7)	9,20 (IQR = 6,4; ранг 1,5 – 16,5)	<b>F = 26,899</b> <b>p = 0,000001 (**)</b>

\*\*p<0,001



Слика 10. Испитаниците со перманентен хипотироидизам имаат сигнификантно пониски вредности на серумски Т4 во однос на испитаниците со транзитoren и субклинички хипотироидизам. \*p<0.05; \*\*p<0,001.

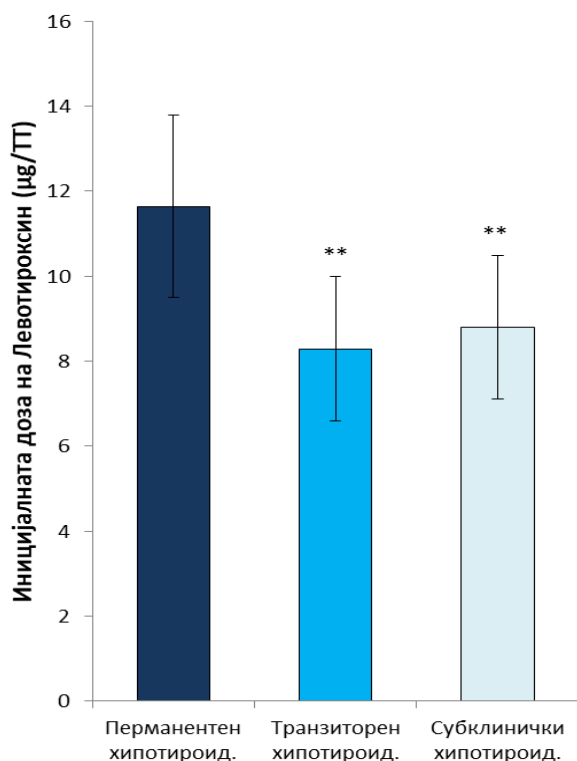
### 7.1.3 Споредба на иницијалната доза на левотироксин ( $\mu\text{g}/\text{TТ}$ ) помеѓу испитаниците со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам

One-Way ANOVA анализата покажа статистички високо сигнификантни разлики помеѓу просеците на иницијалната доза на Левотироксин ( $\mu\text{g}/\text{TТ}$ ) меѓу испитаниците од трите групи ( $p = 1,77 \cdot 10^{-10}$ ). Post-Hoc Tukey HSD тестот покажа дека испитаниците со перманентен хипотироидизам иницијално биле третирани со сигнификантно повисоки дози на левотироксин во однос на испитаниците со транзитoren ( $p = 6,645 \cdot 10^{-9}$ ) и субклинички хипотироидизам ( $p = 0,000003$ ), но нема сигнификантна разлика во иницијалната доза на левотироксин помеѓу пациентите со транзитoren и субклинички хипотироидизам. Резултатите се прикажани на табела 12 и слика 11.

Табела 12. Споредба на иницијалната доза на Левотироксин ( $\mu\text{g}/\text{TТ}$ ) помеѓу пациентите со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам

Параметри	Перманентен хипотироид.	Транзитoren хипотироид.	Субклинички хипотироид.	Сигнификантност
Иницијалната доза на Левотироксин ( $\mu\text{g}/\text{TТ}$ )	$11,64 \pm 2,14$	$8,29 \pm 1,70$	$8,80 \pm 1,69$	<b>F = 29,491</b> <b>p = <math>1,77 \cdot 10^{-10}</math> (**)</b>

\*\*p<0,001



Слика 11. Кај пациентите со перманентен хипотироидизам била иницирана сигнификантно повисока доза на левотироксин во однос на пациентите со транзиторен и субклинички хипотироидизам.  $p < 0.001$ .

#### 7.1.4 Споредба на вредноста на TSH (mIU/L) по 1 месец од отпочнувањето со терапија меѓу испитаниците со перманентен, транзиторен и субклинички хипотироидизам

Иако постоеше пациентите со перманентен хипотироидизам беа асоцирани со повисоки иницијални вредности на TSH при дијагностицирањето, статистичката анализа покажаа **отсуство** на сигнификантни разлики во нивоата на TSH по 1 месец од отпочнувањето со терапија меѓу испитаниците со перманентен, транзиторен и субклинички хипотироидизам. (Табела 13)

Табела 13. Споредба на вредноста на TSH (mIU/L) 1 месец по отпочнувањето со терапија меѓу испитаниците со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам

Параметри	Перманентен хипотироид.	Транзитoren хипотироид.	Субклинички хипотироид.	Сигнификантност
Нивоа на TSH 1 месец по отпочнување со терапија (mIU/L)	3,37 (IQR = 9,95; ранг <1 – 60)	2,20 (IQR = 3,29; ранг <1 – 9,61)	2,20 (IQR = 5,18; ранг <1 – 11,10)	F = 2,760 p = 0,252 (n.s.)

### 7.1.5 Споредба на дозата на левотироксин во 1-вата, 2-рата и 3-тата година ( $\mu\text{g}/\text{TT}$ ) меѓу испитаниците со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам

Сумарно, споредбата на дозите на Левотироксин на 1-вата, 2-рата и 3-тата година ( $\mu\text{g}/\text{TT}$ ) меѓу трите дијагностички групи е прикажана во Табела 14.

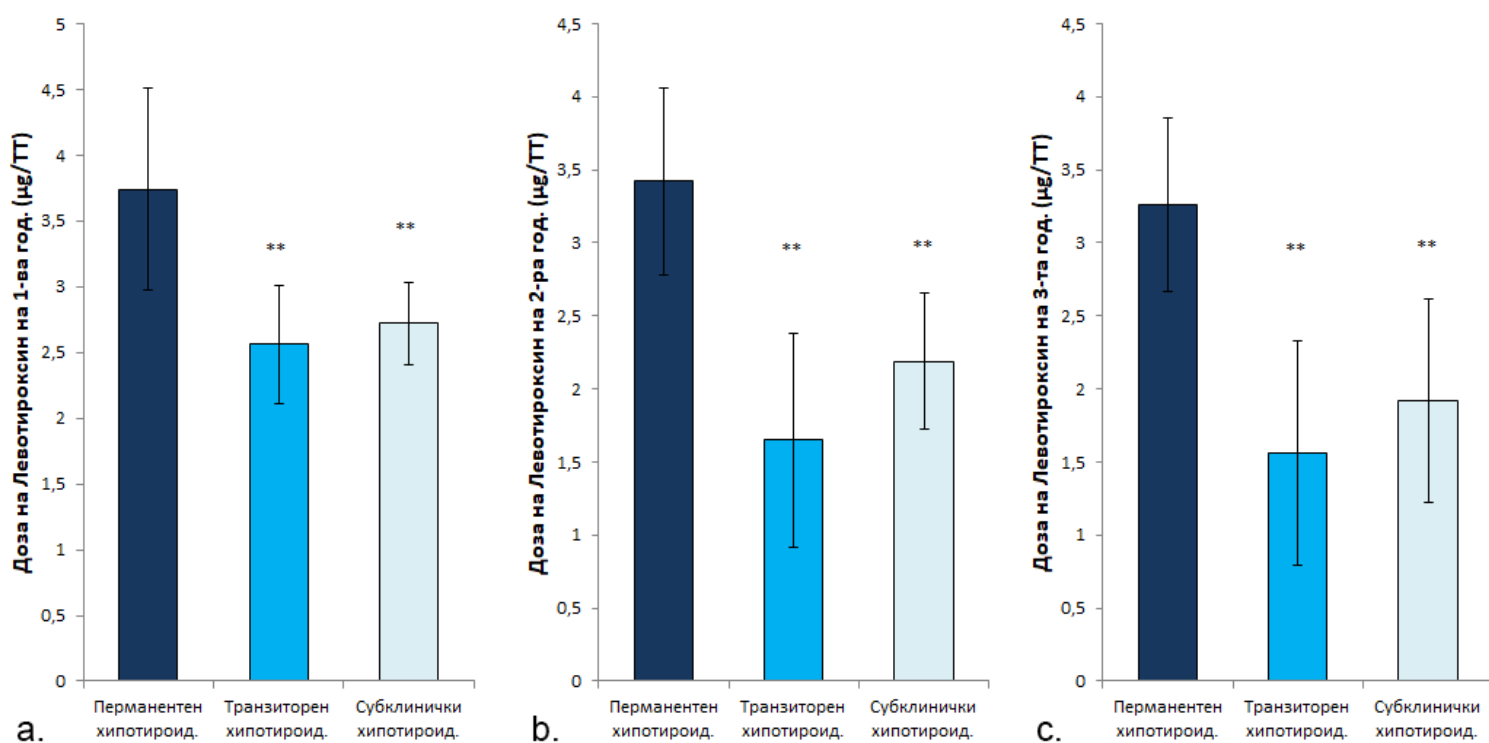
Табела 14. Доза на Левотироксин на 1-вата, 2-рата и 3-тата год. ( $\mu\text{g}/\text{TT}$ ) меѓу пациентите со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам

Параметри	Перманентен хипотироид.	Транзитoren хипотироид.	Субклинички хипотироид.	Сигнификантност
Доза на Левотироксин на возраст од 1 год. ( $\mu\text{g}/\text{TT}$ )	3,74 $\pm$ 0,77	2,56 $\pm$ 0,45	2,72 $\pm$ 0,31	F = 39,712 p = 3,69 $\cdot$ 10 <sup>-13</sup> (**)
Доза на Левотироксин на возраст од 2 год. ( $\mu\text{g}/\text{TT}$ )	3,42 $\pm$ 0,64	1,65 $\pm$ 0,73	2,19 $\pm$ 0,47	F = 79,741 p = 2,78 $\cdot$ 10 <sup>-19</sup> (**)
Доза на Левотироксин на возраст од 3 год. ( $\mu\text{g}/\text{TT}$ )	3,26 $\pm$ 0,59	1,56 $\pm$ 0,77	1,92 $\pm$ 0,70	F = 50,665 p = 1,59 $\cdot$ 10 <sup>-14</sup> (**)

\*\*p<0,001

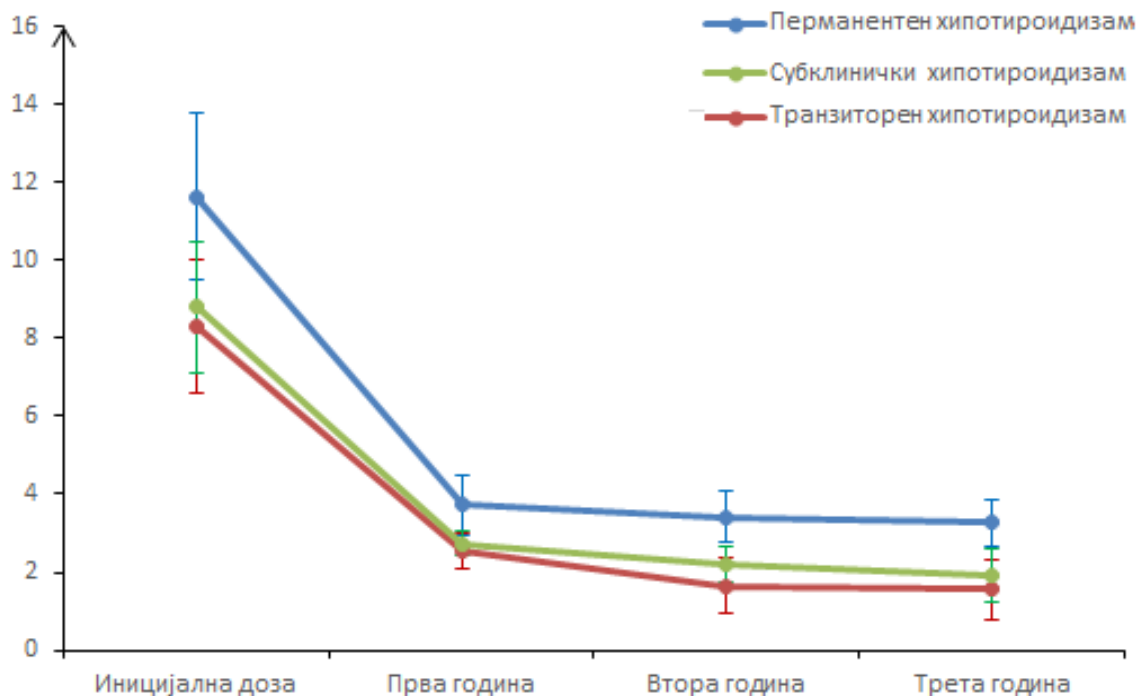
One-Way ANOVA анализата покажа статистички високи сигнификантни разлики во просеците дозата на Левотироксин ( $\mu\text{g}/\text{TT}$ ) на возраст од 1 година (p = 3,69 $\cdot$ 10<sup>-13</sup>), на возраст од 2 години (p = 2,78 $\cdot$ 10<sup>-19</sup>) и на возраст од 3 години (p = 1,59 $\cdot$ 10<sup>-14</sup>) помеѓу пациентите од трите дијагностички групи. Post-Hoc Tukey HSD тестот покажа дека испитаниците со перманентен хипотироидизам биле третираны со сигнификантно

повисоки дози на левотироксин во првата година во однос на пациентите со транзитoren ( $p = 5,11 \cdot 10^{-9}$ ) и субклинички хипотироидизам ( $p = 5,08 \cdot 10^{-9}$ ), слика 12а. Исто така, пациентите со перманентен хипотироидизам биле третирани со сигнификантно повисоки дози на левотироксин и во втората година и во третата година од животот во однос на пациентите со транзитoren (вредности на  $p = 5,10 \cdot 10^{-9}$  и  $p = 5,10 \cdot 10^{-9}$ , соодветно) и субклинички хипотироидизам (вредности на  $p = 6,14 \cdot 10^{-9}$  и  $p = 6,70 \cdot 10^{-9}$ , соодветно), слика 12б и 12с.



Слика 12. Споредба на дозата на левотироксин на возраст од една, две и три години ( $\mu\text{g}/\text{TT}$ ) меѓу пациентите со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам. Пациентите со перманентен хипотироидизам примале сигнификантно повисоки дози на левотироксин во првата (а), втората (б) и третата година (с) во однос на пациентите со транзитoren и субклинички хипотироидизам.

Терапискиот тренд на дозата на левотироксин во тек на следењето на пациентите кај сите три дијагностички групи е претставен графички на слика 13.



Слика 13. Тераписки дози на левотироксин во текот на следењето кај пациентите со перманентен, транзиторен и субклинички хипотироидизам.

## 7.2 Анализа на испитуваните параметри при дијагностичката ре-евалуацијата

Дијагностичката ре-евалуација беше направена на сумарно на средна возраст од 4,5 години. Возраста на ре-евалуација кај поедините групи на хипотироидизам е претставена на табела 15.

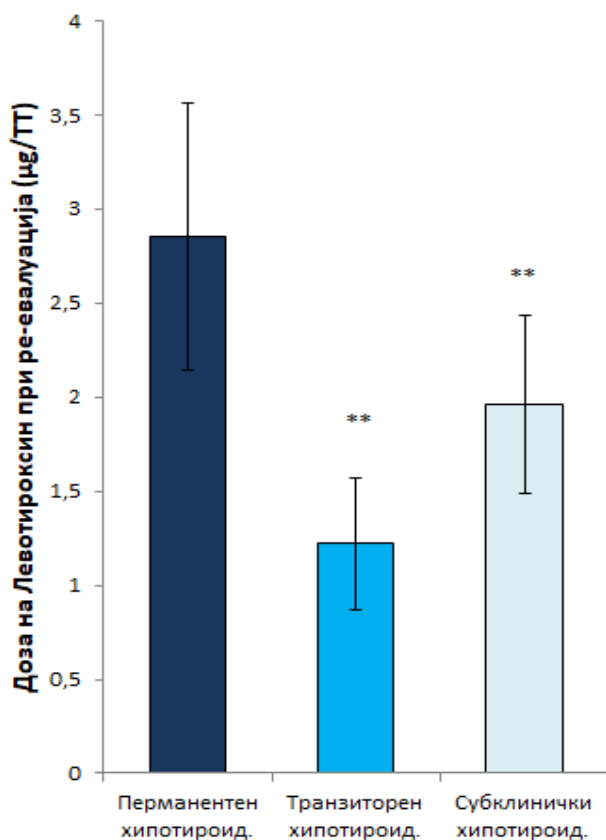
Табела 15. Возраста при ре-евалуација (години) кај пациентите со перманентен, транзиторен и субклинички хипотироидизам

Параметри	Перманентен хипотироид.	Транзиторен хипотироид.	Субклинички хипотироид.
Возраст при ре-евалуација (години)	5,75 (IQR =4,50; ранг 3 - 14)	2,50 (IQR =2,25; ранг 1,8 – 8,5)	3,40 (IQR = 2,0; ранг 2 – 9)

Сите пациенти беа во еутиреотична состојба и на редовна левотироксинска терапија при ре-евалуацијата. Терапијата беше прекината во просечен временски период од 30 дена (ранг: 28-40 дена). Ги анализиравме дозите на терапијата помеѓу пациентите со перманентен, транзиторен и субклинички хипотироидизам во моментот на дијагностичката ре-евалуација. (Табела 16) One-Way ANOVA анализата покажа статистички високо сигнификантни разлики во просеците на дозата на левотироксин ( $\mu\text{g}/\text{TT}$ ) при ре-евалуацијата помеѓу пациентите од трите групи ( $p = 4,39 \cdot 10^{-19}$ ), односно со Post-Hoc Tukey HSD тестот се покажа дека пациентите со перманентен хипотироидизам примале сигнификантно повисоки дози на левотироксин при ре-евалуацијата, во однос на пациентите со транзиторен ( $p = 5,10 \cdot 10^{-9}$ ) и субклинички хипотироидизам ( $p = 8,40 \cdot 10^{-7}$ ), Слика 14.

Табела 16. Доза на Левотироксин при ре-евалуација ( $\mu\text{g}/\text{TT}$ ) меѓу пациентите со перманентен, транзиторен и субклинички хипотироидизам

Параметри	Перманентен хипотироид.	Транзиторен хипотироид.	Субклинички хипотироид.	Сигнификантност
Доза на Левотироксин при ре-евалуација ( $\mu\text{g}/\text{TT}$ )	$2,85 \pm 0,71$	$1,22 \pm 0,35$	$1,96 \pm 0,47$	$F = 47,250$ $p = 4,39 \cdot 10^{-19}$ (**)



Слика 14.

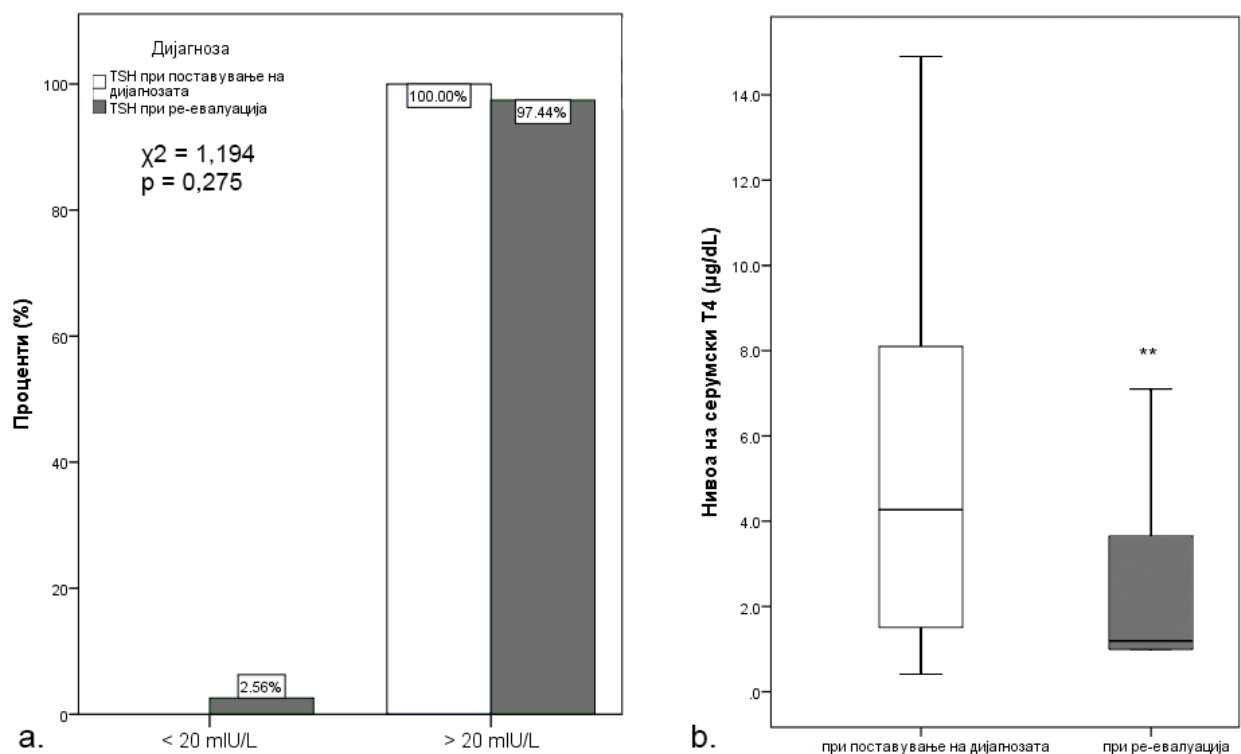
Пациентите со перманентен хипотироидизам примаа сигнификантно повисоки дози на левотироксин при ре-евалуацијата, во однос на пациентите со транзиторен и субклинички хипотироидизам.  $**p < 0.001$ .

### 7.2.1 Споредба на нивоата на серумски TSH при поставување на дијагноза и при ре-евалуација кај пациентите со перманентен хипотироидизам

Споредбите се претставени на табела 17 и слика 15. Како што се забележува, не постои сигнификантна разлика во фреквенциите на испитаниците кои имаат нивоа на серумски TSH кои се  $< 20$  mIU/L и  $> 20$  mIU/L при поставувањето на дијагнозата на КХ во неонатална возраст и при дијагностичката ре-евалуација. Спротивно пак, непараметрискиот Wilcoxon Signed-Ranks тест за зависни примероци покажа високо сигнификантна разлика во медијаните на серумскиот T4 при поставување на дијагнозата и при ре-евалуација.

Табела.17 Споредба на вредностите на серумскиот TSH и T4 кај пациентите со перманентен хипотироидизам при поставување на дијагнозата и при ре- евалуацијата

Параметри	При поставување на дијагноза	При реевалуација	Сигнификантност
Нивоа на серумски TSH < 20 mIU/L >20 mIU/L	0% 100%	2,6% 97,4%	$\chi^2 = 1,194$ $p = 0,275$ (n.s.)
Нивоа на серумски T4 ( $\mu\text{g/dL}$ )	4,27 (IQR = 6,7; ранг 0,4 – 14,9)	1,19 (IQR = 2,8; ранг 1 – 9,8)	$Z = -4.342$ $P = 0,00001$



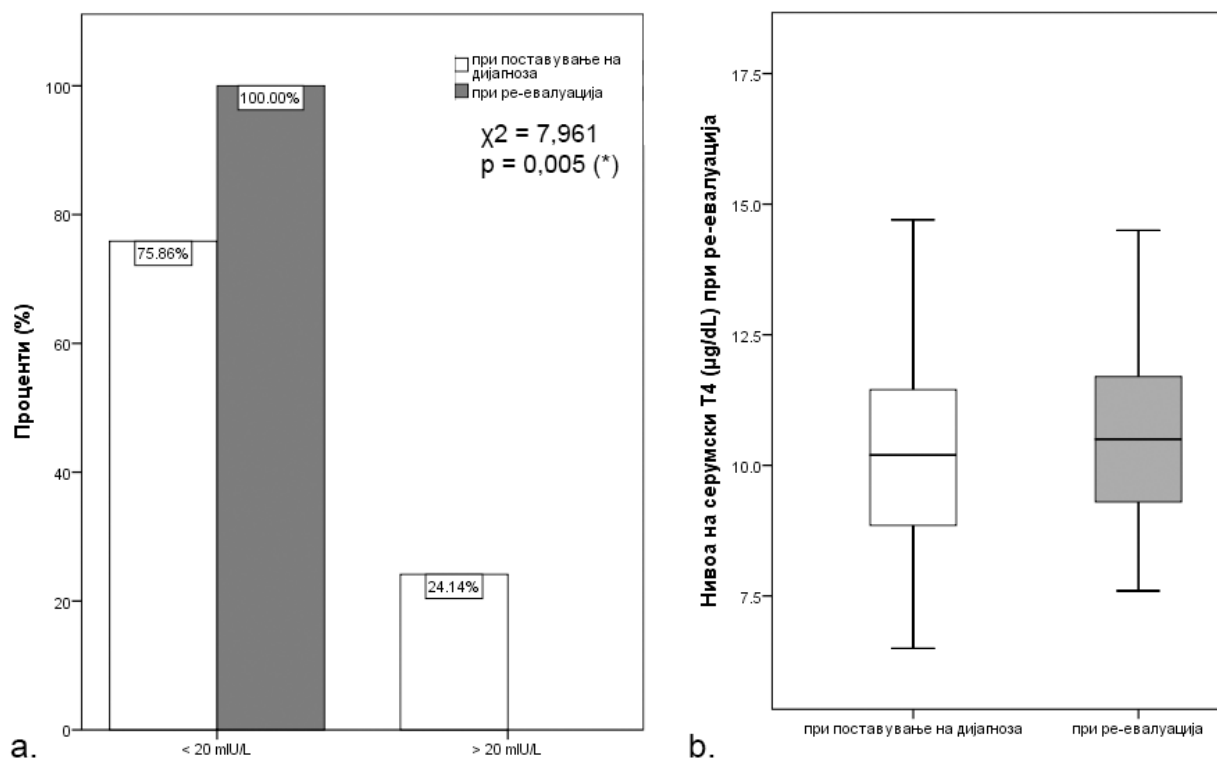
Слика 15. Споредба на нивоата на серумски TSH и T4 при поставување на дијагноза и при ре-евалуација кај пациентите со перманентен хипотироидизам. а. Не постои разлика во нивоата на TSH и (б) се забележува сигнификантно пониски нивоа на T4 при ре-евалуацијата, во однос на иницијалните нивоа при поставување на дијагнозата кај пациентите со перманентен хипотироидизам.

### 7.2.2 Споредба на нивоата на серумски TSH и T4 при дијагнозата на КХ и при ре-евалуацијата кај пациентите со транзитoren хипотироидизам

Споредбите се претставени на Табела 18 и слика 16. Како што може да се забележи, вредностите на TSH при ре-евалуацијата беа сигнификантно пониски, во споредба со вредностите при иницијалното поставување на дијагнозата, кога вредноста на TSH беше >20 mIU/L беше присутна кај значително поголем процент од пациентите. Во однос на нивоата на T4, не беше присутна сигнификантна разлика во медијаните при иницијалното мерење и, при ре-евалуацијата.

Табела 18. Споредба помеѓу вредностите на TSH и T4 при поставување на дијагнозата на КХ и при дијагностичката ре-евалуација кај пациентите со транзитoren хипотироидизам

Параметри	При поставување		Сигнификантност
	дијагноза	При ре-евалуација	
Нивоа на серумски TSH			
< 20 mIU/L	75,9%	100%	$\chi^2 = 7,961$
>20 mIU/L	24,1%	0%	<b>p = 0,005 (*)</b>
Нивоа на серумски T4 (µg/dL)	10,2 (IQR = 2,9; ранг 6,4 – 14,7)	10,5 (IQR = 2,5; ранг 7,6 – 16,2)	Z = -4.983 P = 0,588 (n.s.)



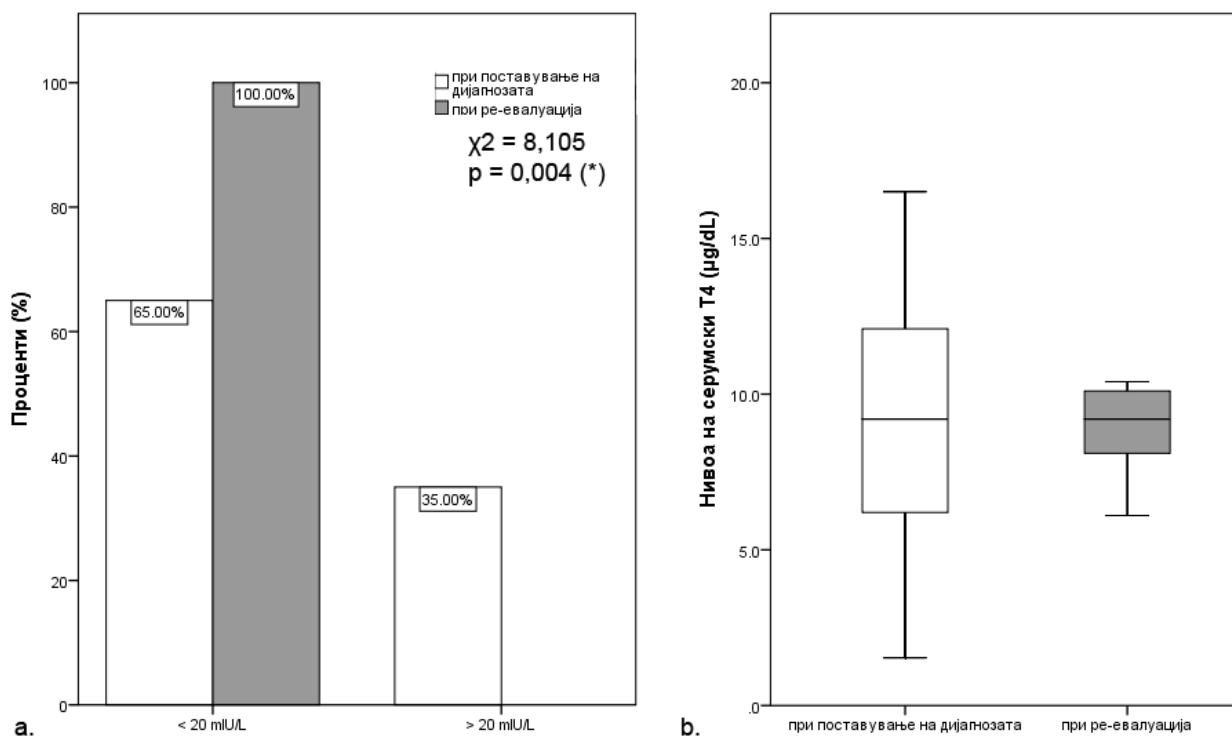
Слика 16. Споредба на нивоата на серумски TSH и T4 при дијагнозата на КХ и при ре-евалуацијата кај пациентите со транзитoren хипотироидизам. а. Вредности на TSH сигнификантно се повисоки при иницијалното поставување на дијагнозата во однос на вредностите при ре-евалуацијата. б. Не постојат сигнификантни разлики во нивоата на серумскиот T4.

### 7.2.3 Споредба на нивоата на серумски TSH при дијагнозата на КХ и при ре-евалуацијата кај пациентите со субклинички хипотироидизам

Во групата на пациенти со дефинитивна дијагноза на субклинички хипотироидизам, слично како и кај групата со транзитoren хипотироидизам, постоеше статистички сигнификантна разлика во вредностите на TSH при поставувањето на дијагнозата на КХ и при ре-евалуацијата, односно значително поголема фреквенција на пациенти има иницијална вредност на TSH >20 mIU/L ( $p = 0,004$ ). Во однос на нивоата на T4, не беа забележани сигнификантни разлики во медијаните при иницијалното мерење и, при ре-евалуацијата. (Табела 19, слика 17)

Табела 19. Споредба на вредностите на серумски TSH и T4 при поставување на дијагнозата и при ре-евалуација кај пациентите со субклинички хипотироидизам

Параметри	При поставување на дијагноза	При ре-евалуација	Сигнификантност
Нивоа на серумски TSH < 20 mIU/L >20 mIU/L	65% 35%	100% 0%	$\chi^2 = 8,105$ <b>p = 0,004 (*)</b>
Нивоа на серумски T4 ( $\mu\text{g/dL}$ )	9,2 (IQR = 6,4; ранг 1,5 – 16,5)	9,2 (IQR = 2,3; ранг 6,1 – 10,4)	Z = -5,087 P = 0,877 (n.s.)



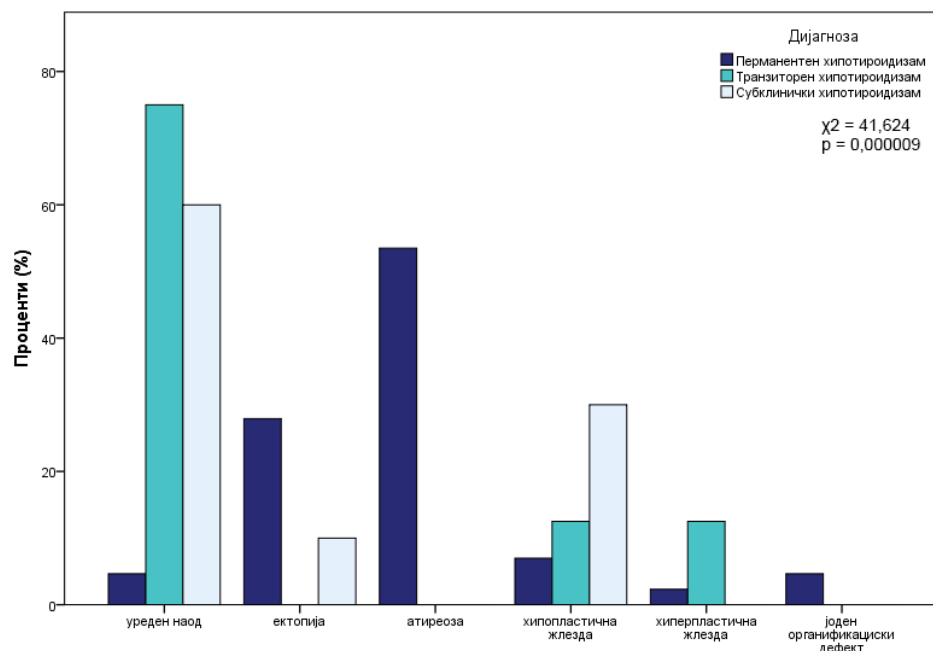
Слика 17. Споредба на нивоата на серумски TSH при дијагнозата на КХ и при ре-евалуацијата кај пациентите со субклинички хипотироидизам. а. иницијалните вредности на TSH сигнификантно се повисоки во однос на вредностите при ре-евалуацијата ( $p = 0,004$ ). б. Не постои сигнификантна разлика во вредностите на T4 при поставување на дијагнозата и при ре-евалуацијата.

## 7.2.4 Анализа на тироидниот скен при ре-евалуација

Сцинтиграфските наоди асоцирани со трите групи на хипотироидизам се претставени на табела 20 и слика 18. Наодите при кои немаше акулулација на радиотрасерот, дури и во случаите каде со ултрасонографијата беше визуелизирано извесно тироидно ткиво беа класифицирани како атиреози и беа застапени во 53,5% од случаите со перманентен хипотироидизам. Тироидните ектопии во најголем процент беа асоцирани со перманентен хипотироидизам, но интересно е да се одбележи дека во еден од нашите случаи со ектопична субментално локализирана тироидна жлезда конгениталниот хипотироидизам беше со карактеристики на субклинички хипотироидизам.

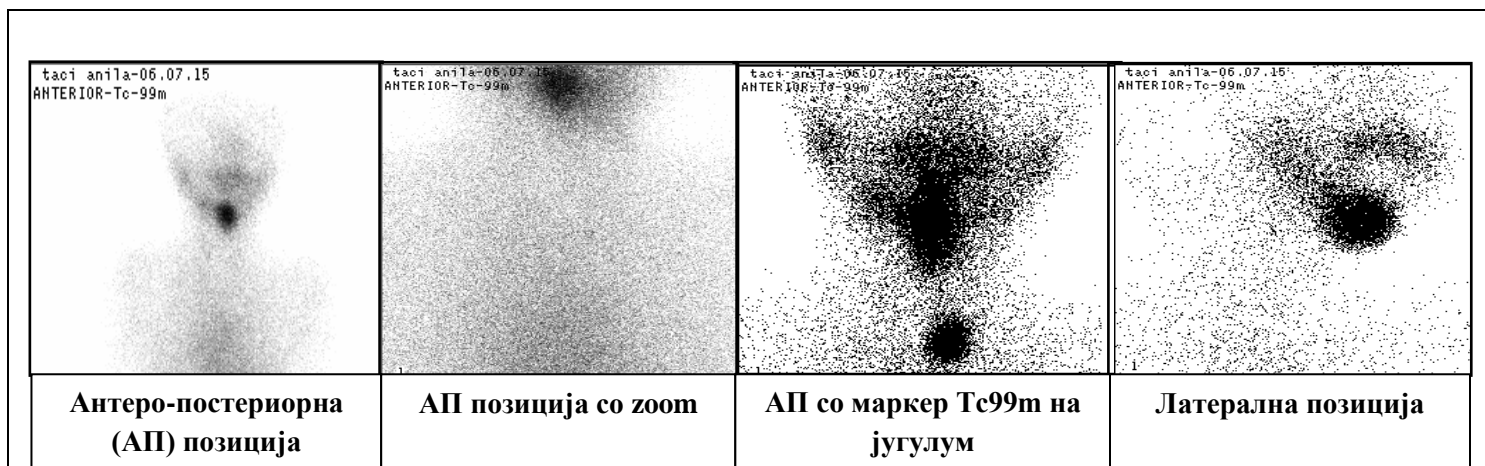
Табела 20. Наоди од тироидна сцинтиграфија кај пациентите со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам

Параметри	Перманентен хипотироид.	Транзитoren хипотироид.	Субклинички хипотироид.
<b>Тироиден скен при ре-евалуација</b>			
уреден наод	4,7%	75,0%	60,0%
ектопија	27,9%	0%	10,0%
атиреоза	53,5%	0%	0%
хипопластична жлезда	7,0%	12,5%	30%
хиперпластична жлезда	7,0%	12,5%	0%



Слика 18.  
Споредба на резултатите од тироидниот скен при ре-евалуација помеѓу пациентите со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам

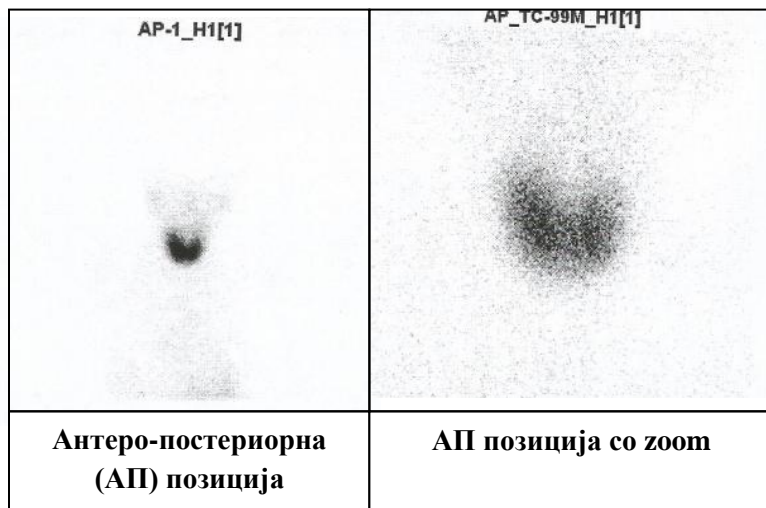
Примери од скинтиграфски наоди се прикажани на слика 19 и 20.



Карактеристики на хипотироидизмот

	При дијагноза	При ре-евалуација
<b>TSH</b> (mIU/l)	30,9	7,8
<b>T4</b> (µg/dL)	4,38	6,9
<b>fT4</b> (ng/dl)		0.856 (реф. 0.89-1.76)
Доза на левотироксин (µg/kg)		
<b>Иницијална</b>	10,5	
<b>На 1 година</b>	3,6	
<b>На 2 години</b>	1,1	
<b>На 3 години</b>	0,9	

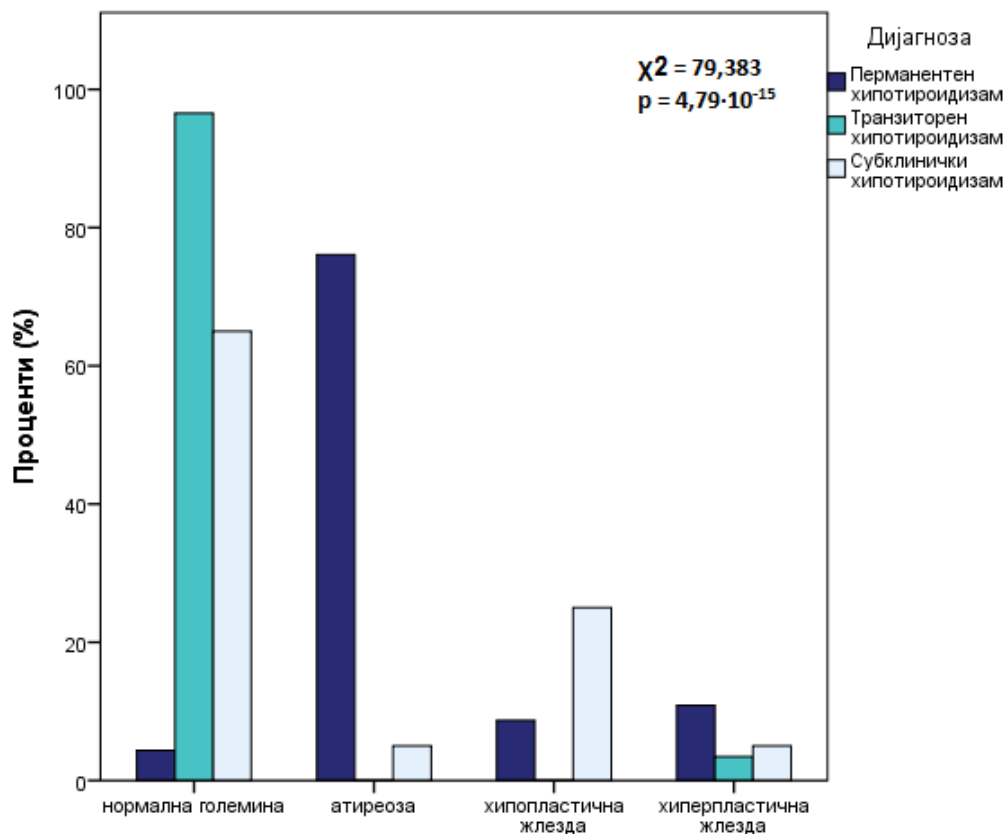
Слика 19. Тироидната скинтиграфија со  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  покажа отсутна радиоактивност во нормалната тироидна жожа, но интензивна акумулација на радиотрасерот по средната вратна линија субментално, укажувајќи на ектопично тироидно ткиво. И покрај јасно покачената вредност на иницијалниот TSH, следењето на пациентот покажа невообичаен тек со потреба од ниски дози на левотироксинска терапија. По ре-евалуацијата дефинитивната дијагноза беше субклинички хипотироидизам.



Слика 20. Тироидната скинтиграфија покажа изразито зголемена тироидна жлезда во нејзината нормална позиција со нехомогена акумулација на радиотрасерот, односно наод сугестивен за тироидна дисхормонгенеза

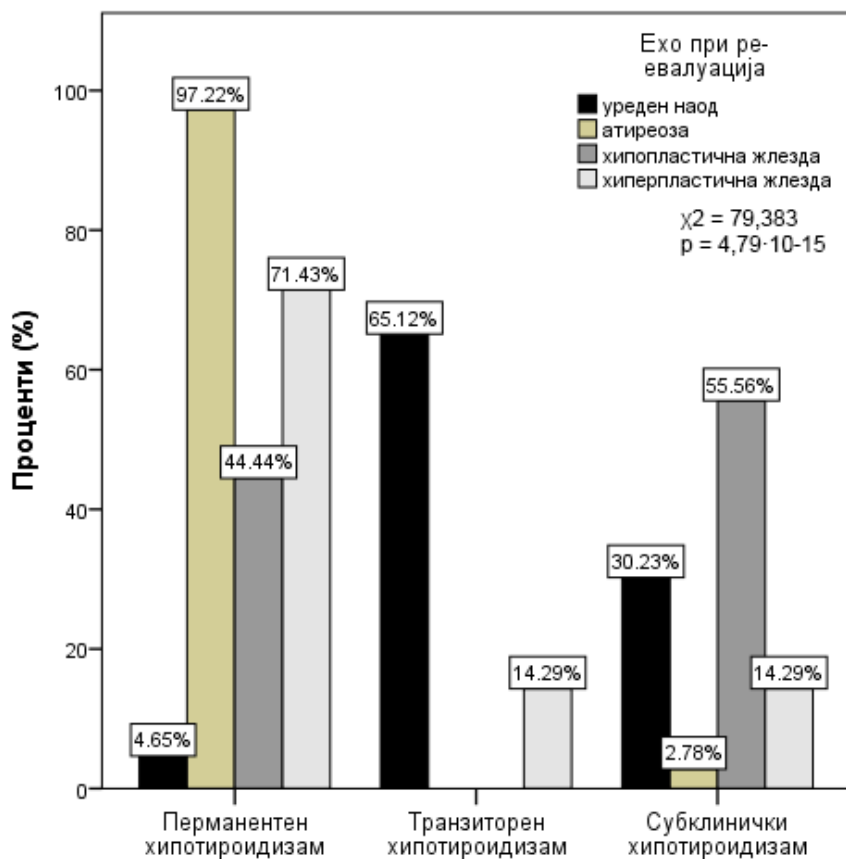
### **7.2.5 Тироидна ултрасонографија во склоп на дијагностичката ре-евалуација кај пациентите со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам**

Наодите од тироидната ултрасонографија и нивната застапеност кај различните дијагностички групи на конгенитален хипотироидизам се претставени на слика 21.



Слика 21. Тироидна ултрасонографија при ре-евалуација кај испитуваната група на пациенти. Уредниот ехосонографски наод беше асоциран со транзиторен или субклинички хипотироидизам. Погolem број од пациентите во нашата студија со хипопластична жлезда беа асоцирани со субклинички хипотироидизам.

На слика 22, која всушност претставува реверзен графикон дефинитивната дијагнозата е поставена на x-оската, а резултатите од ултрасонографијата се користени за пресметување на фреквенциите.



Слика 22. Перманентниот хипотироидизам во нашата студија беше асоциран со сите ултрасонографски наоди (атиреоза, хипопластична, хиперпластична и нормална по големина и ехоструктура тироидна жлезда). Нормалниот пак ултразвучен наод во 65,12% беше асоциран со транзиторен, а во 30,23% со субклинички хипотироидизам. Повеќе од половината од ултразвучните наоди на хипопластична тироидна жлезда (55,56%) беа асоцирани со субклинички тип на хипотироидизам.

### 7.2.6 Споредба помеѓу иницијалниот ултразвучен наод и ултразвучниот наод при ре-евалуацијата кај пациентите со перманентен, транзиторен и субклинички хипотироидизам

На табела 21 е претставена споредбата на ултрасонографските наоди, иницијалниот и при ре-евалуацијата кај трите групи на конгенитален хипотироидизам

Табела 21. Споредба меѓу наодите од тироидна ултрасонографија при поставување на дијагнозата на КХ и при ре-авалуацијата кај различните типови на хипотироидизам

Ултрасонографија	Перманентен хипотироид.	Р-вредност	Транзиторен хипотироид.	Р-вредност	Субклинички хипотироид.	Р-вредност
<b>При поставување на дијагнозата</b>						
нормална големина	6,5%	$\chi^2 = 7,050$ $p = 0,070$ (n.s)	82,1%	$\chi^2 = 10,117$ $p = 0,017$ (n.s)	75%	$\chi^2 = 8,041$ $p = 0,045$ (*)
атиреоза	60,9%		0%		5%	
хипопластична жлезда	21,7%		10,7%		10%	
хиперпластична жлезда	10,9%		7,1%		10%	
<b>При ре-авалуација</b>						
нормална големина	4,3%		96,6%		65,0%	
атиреоза	76,1%		0%		5,0%	
хипопластична жлезда	8,7%		0%		25,0%	
хиперпластична жлезда	10,9%		3,4%		5,0%	

Ултрасонографскиот наод кај нашите пациенти не се разликуваше значајно при поставувањето на дијагнозата и во тек на ре-авалуацијата. Единствено разлики беа детектирани кај пациентите со дијагноза на субклинички хипотироидизам, односно кај поголем број на пациенти иницијалните ултрасонографски мерења на тироидната жлезда биле проценети како уредни, а во тек на дијагностичката ре-авалуација истите беа под стандардите за возраста и се класифицирани како тироидна хипоплазија. Освен тоа, во 3 случаи кај кои со скинтиграфијата беше дијагностицирана ектопична тироидна жлезда, иницијалната тироидна ултрасонографија беше со наод на хипопластично ткиво во нормалната тироидна позиција, додека пак при ре-авалуацијата не беше визуелизирано тироидно ткиво во тироидната ложа.

Споредбата помеѓу наодите од тироидната скинтиграфија и ултрасонографија во тек на студијата, односно при ре-авалуацијата на пациентите со конгенитален хипотироидизам е претставена на Табела 22.

Табела 22. Споредба помеѓу скинтиграфскиот и ултрасонографски наод.

Ултрасонографија						
Тироиден скен	Нормална	Зголемена	намалена	отсутна	Ектопична	хемиагенезија
Нормална акумулација	12					
Зголемена		7				
Намалена	2		7			
Отсутна				21		2
Ектопична				13		

Несовпаѓањата помеѓу двете имиџинг испитувања се означени со сина боја

Кај 21 пациент со конгенитален хипотироидизам со ултрасонографскиот преглед прецизно беше дијагностицира тироидна агенезија, со неприкажување на жлезда во тироидната ложа. Но, со ултрасонографскиот тироиден преглед не беше возможно да се дијагностицира тироидна ектопија и тој беше различен од скинтиграфскиот наод кај сите 13 случаи со тироидни ектопии. Кај два пациенти со скинтиграфски наод на атиреоза, со ултразвучниот преглед беше визуелизирана хемитироидеа.

### 7.3 Споредба на анализираните параметри меѓу различните етиолошки типови на хипотироидизам – тироидни дизгенези и тироидни дисхормоногенези

По дијагностичката ре-евалуација пациентите врз основа на ултрасонографскиот и сцинтиграфскиот наод беа класифицирани во следните етиолошки субгрупи :

- 1) Пациенти со **тироидна дизгенеза** (n=43; 86%) и тоа:
  - ✓ Агенезија (n=23; 53%)
  - ✓ Тироидна ектопија (n=13; 30%)
  - ✓ Тироидна хипоплазија (n=7; 17%)
- 2) Пациенти со **тироидна дисхормоногенеза** (n=7; 14%)

Од вкупно 50 пациенти, 45 беа со дефинитивна дијагноза на перманентен хипотироидизам, а останатите 5 пациенти беа со карактеристики на субклинички хипотироидизам.

Половината од случаите со тироидни дизгенези покажаа комплетно отсуство на акумулација на радиотрасерот во тироидната ложа или на други локализации, односно атиреозите беа најчестата група на тироидни дизгенези, како и воопшто најчестата етиологија на перманентен примарен конгенитален хипотироидизам.

Во 30% од случаите со тироидна дизгенеза, односно кај 10 женски и 3 машки деца, беше визуелизирана ектопична тироидна жлезда. Помеѓу тироидните ектопии најчесто присутна беше сублингвалната ектопија кај 6 пациенти со КХ; лингвалната во 5 случаи и субментално позиционирана кај 2 деца. Тироидната хипоплазија беше присутна во 17% од случаите.

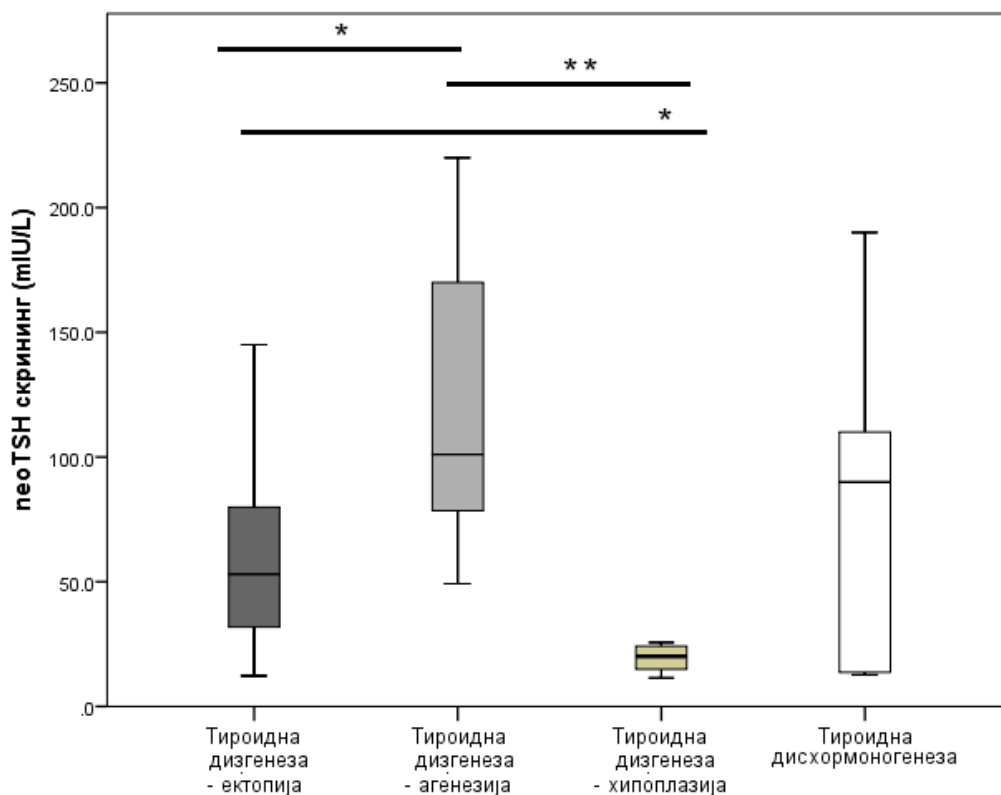
Тироидната дисхормоногенеза дијагностицирана со комбинација на ултразвучниот и сцинтиграфскиот наод или пак со молекуларни анализи, како етиолошки причинител на перманентниот хипотироидизам беше застапена во 14% од случаите.

Споредбата на анализираните варијабли меѓу различните етиолошки субтипови на хипотироидизам: тироидна дизгенеза (тироидна ектопија, тироидна агенезија, тироидна хипоплазија) и тироидна дисхормоногенеза се сумирани во следната табела (Табела 23).

Табела 23. Споредба на анализираните параметри меѓу различните субтипови на хипотироидизам

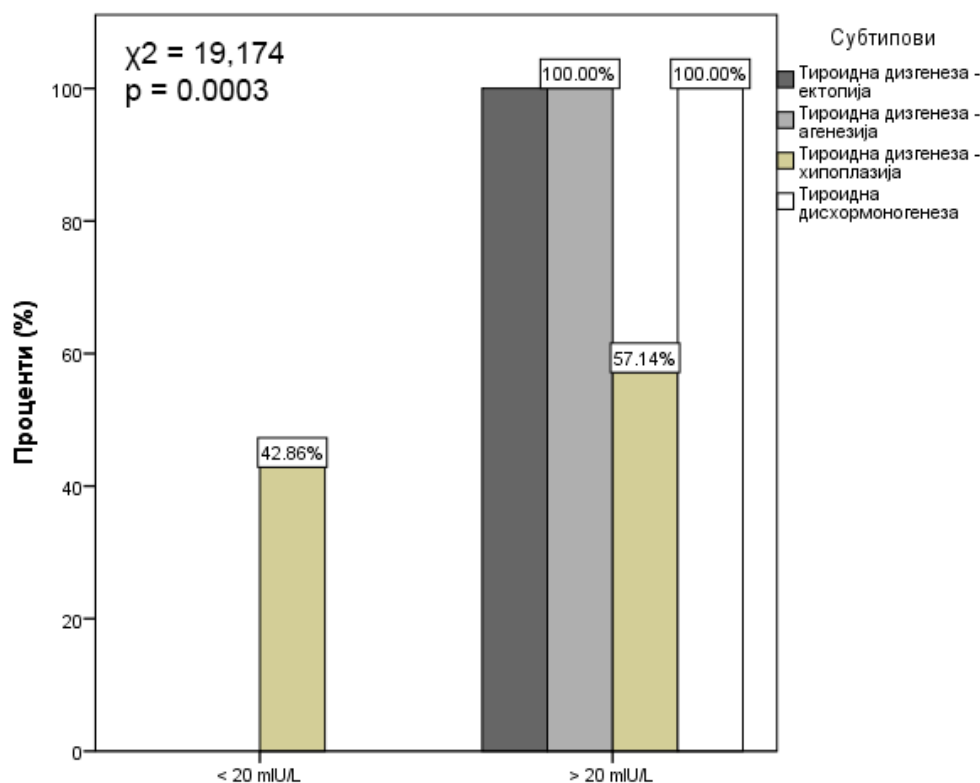
Параметри	Тироидна дизгенеза – ектопија	Тироидна дизгенеза - агенезија	Тироидна дизгенеза – хипоплазија	Тироидна дисхормоно- генеза	Сигнифик.
неоTSH скрининг (mIU/L)	53,0 (IQR = 67,8; ранг 12,3 – 145,0)	101,0 (IQR = 92,2; ранг 49,2 – 220,0)	20,0 (IQR = 11,9; ранг 11,4 – 25,7)	90,0 (IQR = 136,8; ранг 12,7 – 190,0)	<b>F = 21,751</b> <b>p = 0,00002</b> <b>(**)</b>
Серумски TSH < 20 mIU/L > 20 mIU/L	0% 100%	0% 100%	42,9% 57,1%	0% 100%	<b><math>\chi^2 = 19,174</math></b> <b>p = 0,0003</b> <b>(**)</b>
Нивоа на серумски T4 ( $\mu\text{g/dL}$ )	6,70 (IQR = 6,50; ранг 0,80 – 14,50)	1,96 (IQR = 3,20; ранг 0,7 – 10,3)	9,10 (IQR = 4,00; ранг 5,2 – 12,1)	1,00 (IQR = 10,1; ранг 0,4 – 14, 9)	<b>F = 14,579</b> <b>p = 0,0007</b> <b>(**)</b>
Иницијална доза на Левотироксин $\mu\text{g/TT}$	11,46 $\pm$ 1,86	12,04 $\pm$ 2,23	10,04 $\pm$ 3,07	10,72 $\pm$ 1,86	F = 22,799 p = 0,215 (n.s.)
Доза на Левотир. на 1-ва год. ( $\mu\text{g/TT}$ )	3,49 $\pm$ 0,51	3,89 $\pm$ 0,82	2,91 $\pm$ 0,79	3,86 $\pm$ 0,83	<b>F = 5,674</b> <b>p = 0,027 (*)</b>
Доза на Левотир. на 2-ра год. ( $\mu\text{g/TT}$ )	3,09 $\pm$ 1,07	3,49 $\pm$ 0,45	2,74 $\pm$ 0,61	3,77 $\pm$ 0,54	<b>F = 4,655</b> <b>p = 0,034 (*)</b>
Доза на Левотир на 3-та год. ( $\mu\text{g/TT}$ )	3,07 $\pm$ 1,09	3,30 $\pm$ 0,37	2,48 $\pm$ 0,47	3,37 $\pm$ 0,55	<b>F = 3,968</b> <b>p = 0,044 (*)</b>
Доза на Левотир. при ре-евалуација $\mu\text{g/TT}$	3,08 $\pm$ 0,88	2,62 $\pm$ 0,54	2,42 $\pm$ 0,62	3,31 $\pm$ 0,87	F = 3,906 p = 0,052 (n.s.)
Серумски TSH при ре-евалуација < 20 mIU/L > 20 mIU/L	7,7% 92,3%	0% 100%	71,4% 28,6%	0% 100%	<b><math>\chi^2 = 24,649</math></b> <b>p = 0,00002</b> <b>(**)</b>
Серумски T4 ( $\mu\text{g/dL}$ ) при ре- евалуација	3,4 (IQR =4,8; ранг 1,0 – 9,8)	1,0 (IQR = 0; ранг 1,0 – 2,1)	9,2 (IQR = 3,3; ранг 6,4 – 10,4)	8,1 (IQR = 1; ранг 7,1 – 9,1)	<b>F = 31,447</b> <b>p = 1,48 <math>\cdot 10^{-7}</math></b> <b>(**)</b>

Со примена на Kruskal-Wallis тестот се покажа дека постојат статистички високо сигнификантни разлики во вредностите на TSH на неонатален скрининг, помеѓу различните субтипови на хипотироидизам ( $F = 21,751$ ,  $p = 0,00002$ ). Последователните Mann-Whitney тестови потврдија дека пациентите со тироидна агенезија имаа сигнификантно повисоко ниво на TSH на неонатален скрининг во однос на пациентите со ектопија ( $p = 0,002$ ) и хипоплазија ( $p = 0.00008$ ). Исто така, пациентите со тироидна ектопија имаа повисоки вредности на TSH на неонатален скрининг во однос на пациентите со хипопластична жлезда ( $p = 0.013$ ) Резултатите се прикажани и на слика 23.



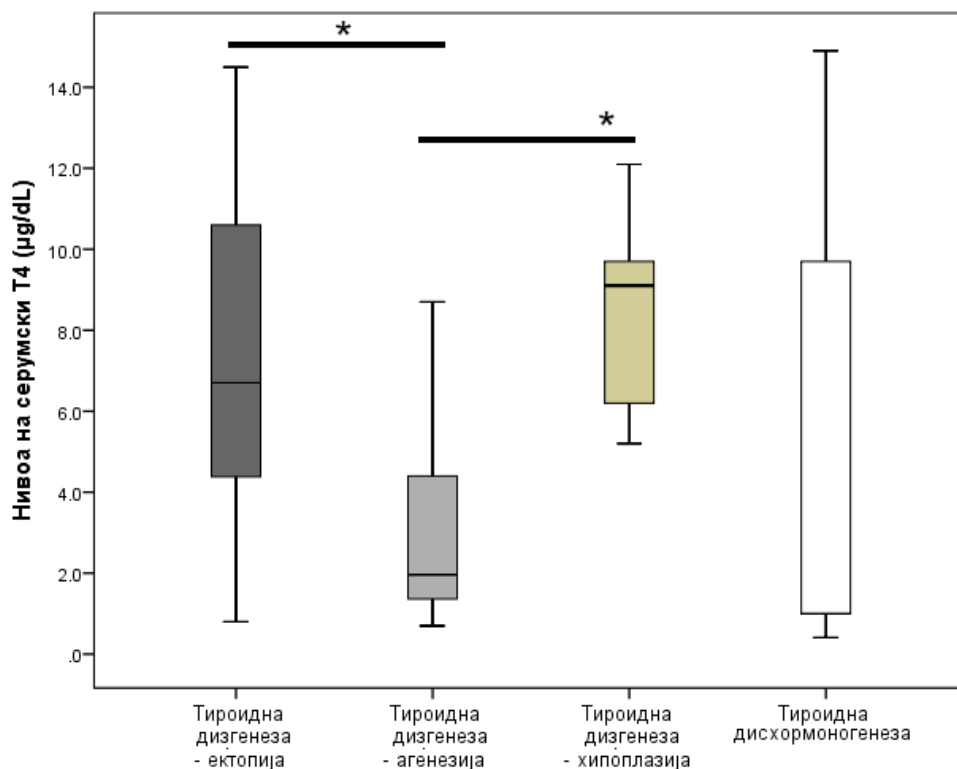
Слика 23. Споредба на вредностите на неоTSH на скрининг (mIU/L) меѓу различните субтипови на хипотироидизам. \* $p < 0,05$  (помеѓу пациентите со агенезија и ектопија, помеѓу ектопија и хипоплазија). \*\* $p < 0,001$  (помеѓу пациентите со агенезија и хипоплазија).

Во однос на вредностите на серумскиот TSH при поставување на дијагнозата на конгенитален хипотироидизам, освен пациентите со тироидна хипоплазија сите останати подгрупи на тироидни дизгенези и тироидните дисхормоногенези се карактеризираа со вредности на TSH > 20 mIU/L (Слика 24).



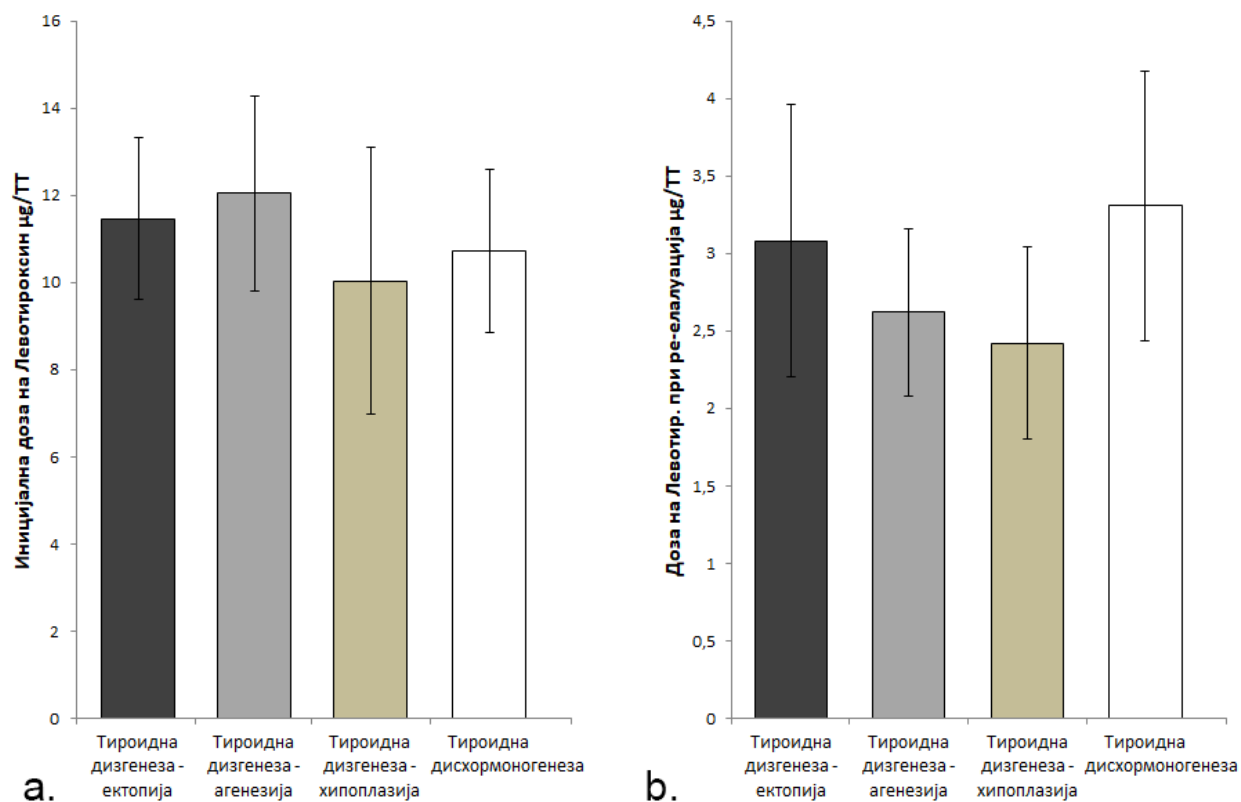
Слика 24. Вредностите на серумски TSH < 20 mIU/L беа присутни во 42,86% од случаите со тироидна хипоплазија.

Во однос на нивоата на серумски T4 ( $\mu\text{g/dL}$ ), Kruskal-Wallis тестот покажа дека постојат статистички високо сигнификантни разлики во вредностите меѓу различните субтипови на хипотироидизам ( $F = 14,579$ ,  $p = 0,0007$ ). Последователните Mann-Whitney тестови потврдија дека пациентите со агенезија имаат сигнификантно пониски нивоа на серумски T4 во однос на пациентите со ектопија ( $p = 0,004$ ) и хипоплазија ( $p = 0,0013$ ). Разликите во вредностите на T4 меѓу останатите групи не се покажаа како статистички значајни (слика 25).



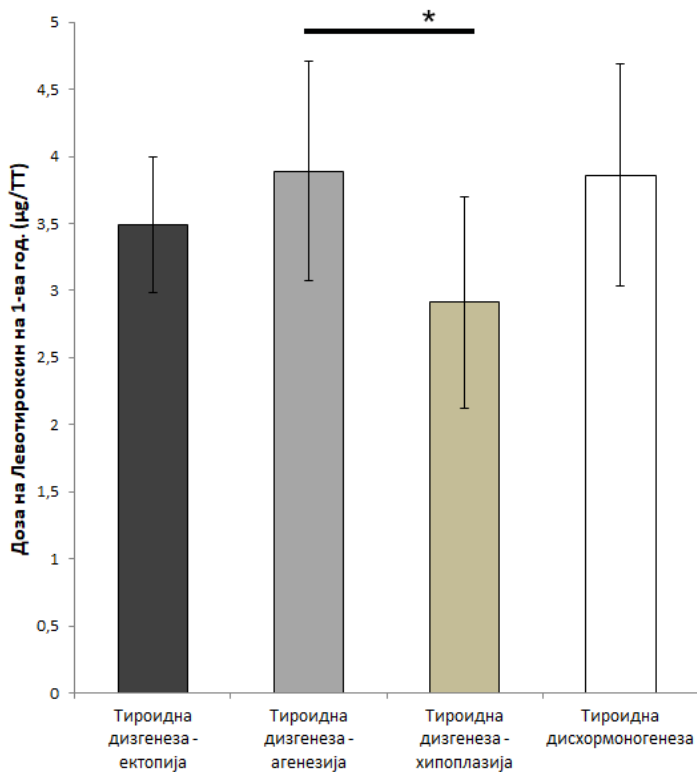
Слика 25. Пациентите со атиреоза имаа сигнификантно пониски нивоа на серумски Т4 во однос на пациентите со тироидна ектопија и хипоплазија. \* $p < 0.05$ .

Во однос на дозите на левотироксин (иницијалната доза, доза на возраст од 1-год, на возраст од 2-год, на возраст од 3-години и при ре-евалуацијата), One-Way ANOVA анализата покажа отсуство на статистички сигнификантни разлики во иницијалната доза и дозата при ре-евалуација меѓу четирите етиолошки субтипа на хипотироидизам (слика 26). Статистички сигнификантни разлики во просеците помеѓу субтиповите на хипотироидизам беа детектирани во дозите на левотироксин во тек на следењето односно на возраст од една, две и три години.



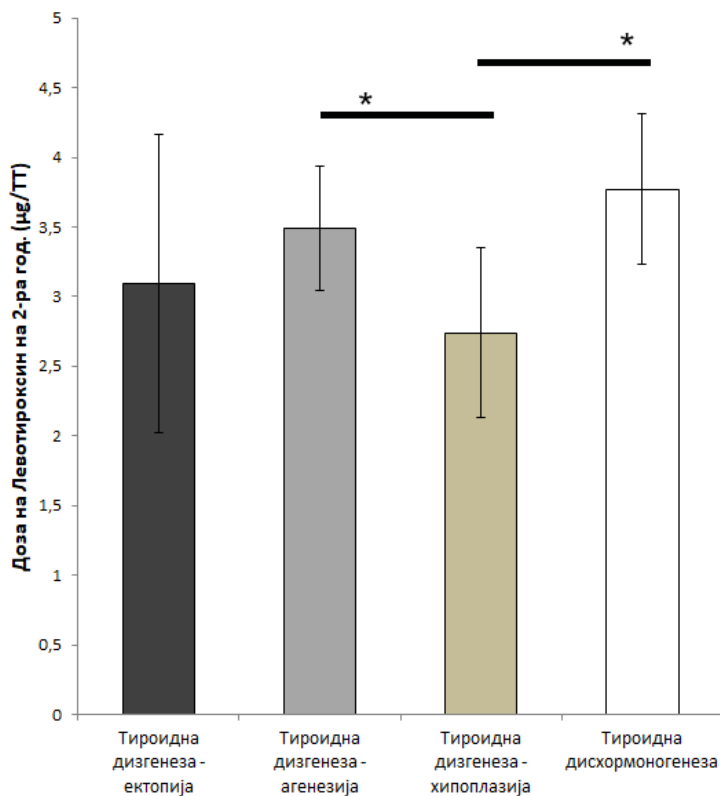
Слика 26. Не постојат статистички сигнификантни разлики во иницијалната доза на левотироксин (а) и дозата при ре-евалуација меѓу четирите субтипа на хипотироидизам (б).

Post Hoc Tukey HSD тестовите покажа статистички сигнификантна разлика на дозата на левотироксин на возраст од една година само помеѓу пациентите со атиреоза и хипоплазија ( $p = 0.021$ ), слика 27. Во однос на дозата на Левотироксин на 2-ра год. ( $\mu\text{g}/\text{TT}$ ), статистички сигнификантни разлики беа утврдени меѓу испитаниците со агенезија и хипоплазија ( $p = 0.011$ , слика 28), како помеѓу оние со хипоплазија и тироидна дисхормоногенеза ( $p = 0.047$ ). Во однос на дозата на Левотироксин на 3-тата год. ( $\mu\text{g}/\text{TT}$ ), статистички сигнификантни разлики беа утврдени само меѓу испитаниците со агенезија и хипоплазија ( $p = 0.036$ , слика 29).



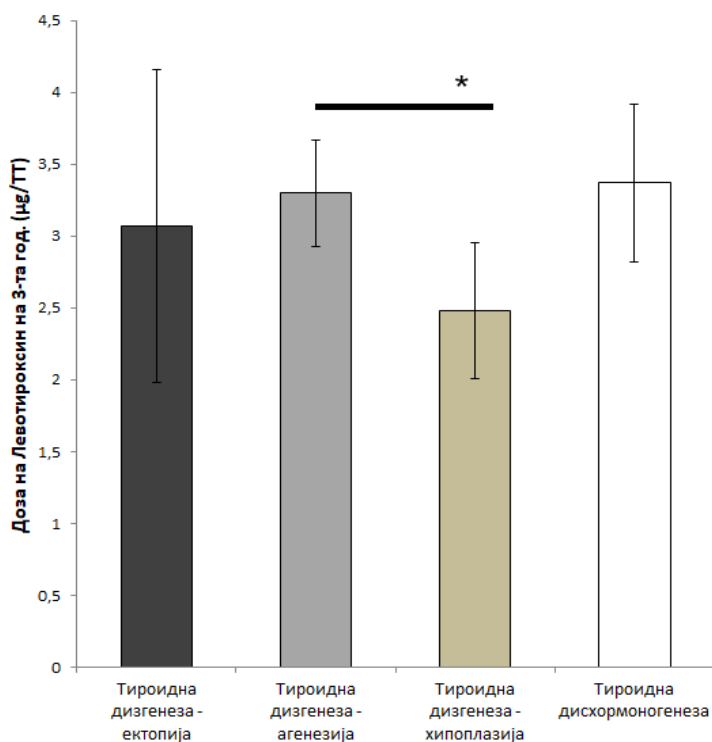
Слика 27.

Пациентите со тироидна хипоплазија беа третирани со статистички сигнификантно пониска доза на Левотироксин на возраст од една година, во однос на пациентите со атиреози. Дозата на левотироксин на возраст од 1 година не се разликуваше сигнификантно помеѓу пациентите со атиреоза, ектопија и дисхормоногенеза.



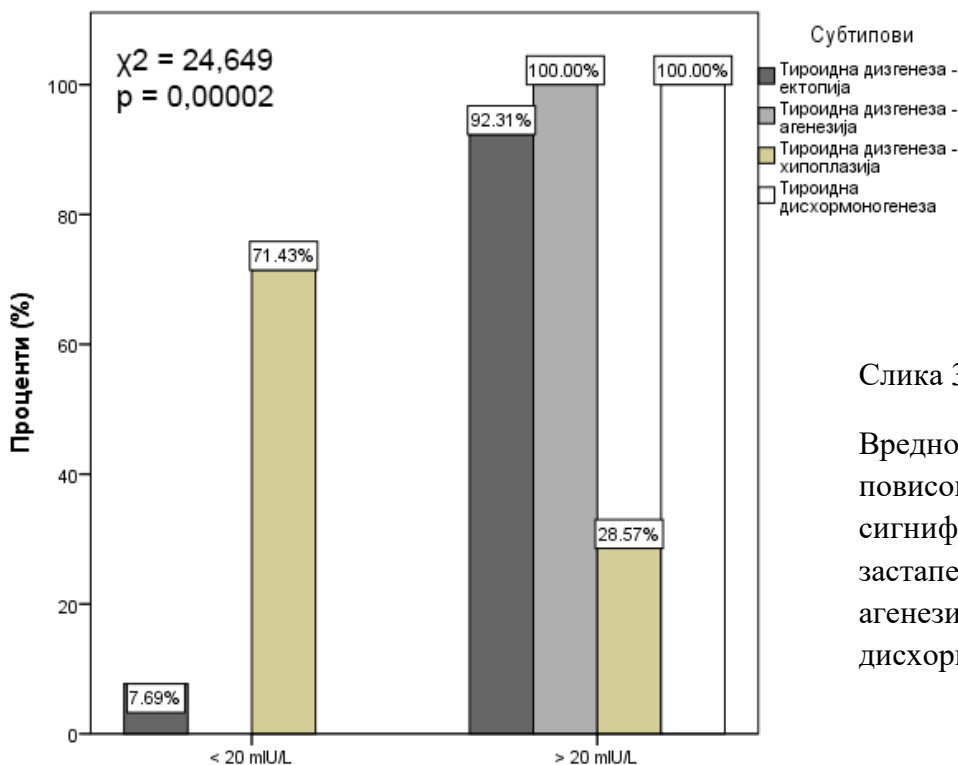
Слика 28.

Дозите на левотироксин на возраст од две години сигнификантно се разликуваа помеѓу пациентите со атиреоза и дисхормоногенеза и пациентите со тироидна хипоплазија.



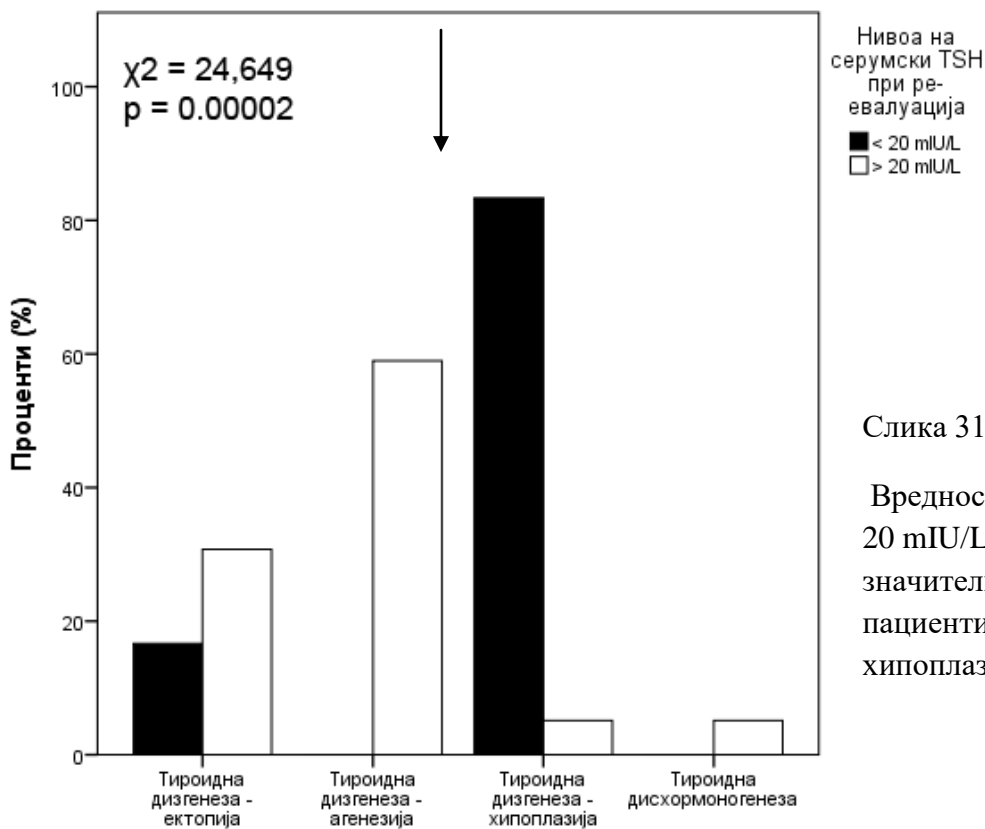
Слика 29. Пациентите со тироидна хипоплазија беа третирани со статистички сигнификантно пониска доза на левотироксин на возраст од 3 години, во однос на оние со агенезија.

Анализата на нивоата на серумскиот TSH во тек на студијата, односно при дијагностичката ре-евалуација покажа сигнификантна разлика помеѓу четирите субгрупи на хипотироидизам. Вредностите на серумскиот TSH  $> 20$  mIU/L беа позастанени кај пациентите со атиреоза и тироидна дисхормоногенеза, додека пак вредноста на TSH  $< 20$  mIU/L беше карактеристична за тироидните хипоплазии. Не беше забележани сигнификантна разлика во вредностите на TSH при ре-евалуацијата помеѓу пациентите со атиреоза и тироидна ектопија, иако истата беше сигнификантна при иницијалните мерења во неонатална возраст. (слика 30, 31)



Слика 30.

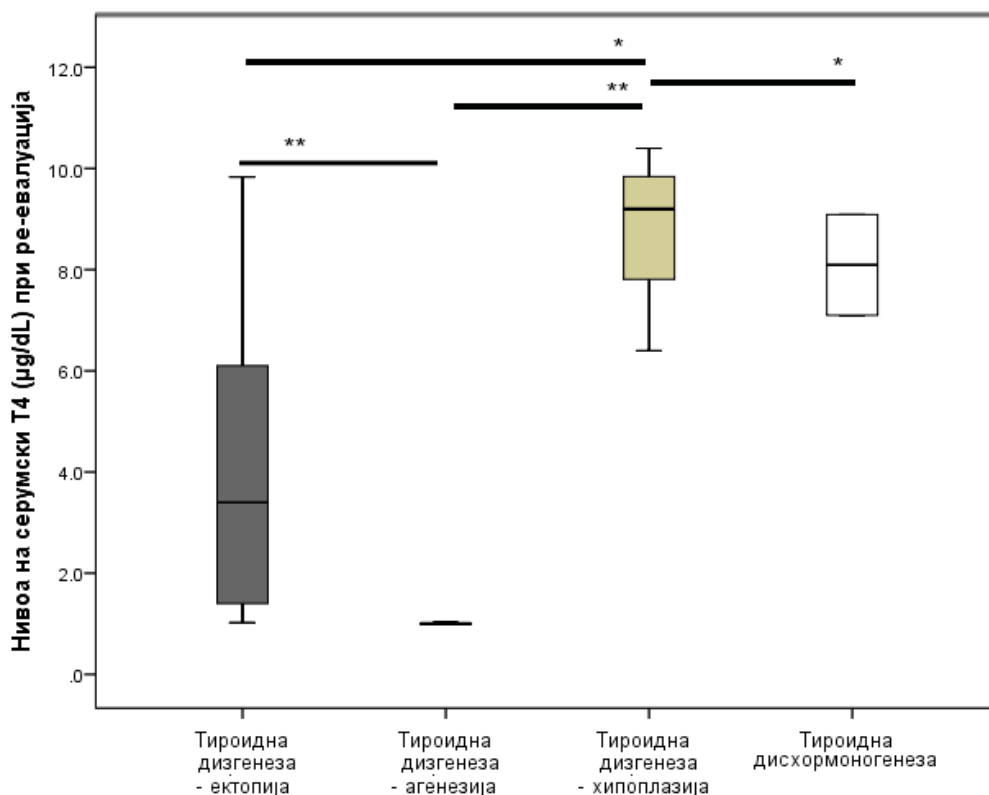
Вредностите на TSH повисоки од 20 mIU/L беа сигнификантно повеќе застапени кај пациентите со агенезија и тироидна дисхормогенеза.



Слика 31.

Вредностите на TSH пониски од 20 mIU/L при ре-евалуацијата беа значително присутни кај пациентите со тироидна хипоплазија.

Во однос на нивоата на серумски Т4 при ре-евалуација, со примена на Kruskal-Wallis тестот се покажа статистички високо сигнификантна разлика во вредностите меѓу различните субтипови на хипотироидизам ( $F = 31,447$ ,  $p = 1,48 \cdot 10^{-7}$ ). Последователните Mann-Whitney тестови потврдија сигнификантни разлики во вредностите на Т4 при ре-евалуација меѓу пациентите со агенезија и тироидна ектопија ( $p = 0.000005$ ), помеѓу пациентите со ектопија и хипоплазија ( $p = 0,002$ ), меѓу испитаниците со агенезија и хипоплазија ( $p = 0.00001$ ) и меѓу испитаниците со агенезија и дисхормоногенеза ( $p = 0,005$ ), Слика 32.



Слика 32. Споредба на нивоата на серумски Т4 при ре-евалуација меѓу пациентите од четирите субтипови на хипотироидизам.

#### 7.4 Корелации помеѓу анализираните варијабли

Биваријантната статистика помеѓу континуираните нумерички варијабли беше извршена со користење на Спермановиот коефициент ( $\rho$ ). На следната табела (Табела 24) прикажана е матрицата на корелации со сумирани резултати.

Табела 24. Матрица на корелации со Спермановиот коефициент ( $\rho$ ) за анализираните континуирани варијабли

	неоTSH скрининг (mIU/L)	Нивоа на серумски T4 ( $\mu\text{g/dL}$ )	Возраст на почнување со терапија	Иниц. доза на Левотир. ( $\mu\text{g/TT}$ )	TSH на 1 месец (mIU/L)	Доза на LT4 на 1 год. ( $\mu\text{g/TT}$ )	Доза на LT4 на 2 год. ( $\mu\text{g/TT}$ )	Доза на LT4 на 3 год. ( $\mu\text{g/TT}$ )	T4 ( $\mu\text{g/dL}$ ) при ре-евалуација	Доза на LT4 при ре-евалуација
неоTSH скрининг (mIU/L)	/	/	-0,345 (**) p = 0,001	0,622 (**) p = 0,000	0,150 p = 0,160	0,611 (**) p = 0,000	0,719 (**) p = 0,000	0,725 (**) p = 0,000	-0,770 (**) p = 0,000	0,632 (**) p = 0,000
Нивоа на серумски T4 ( $\mu\text{g/dL}$ )	-0,719 (**) p = 0,000	/	0,087 p = 0,427	-0,537 (**) p = 0,000	-0,206 p = 0,063	-0,581 (**) p = 0,000	-0,563 (**) p = 0,000	-0,584 (**) p = 0,000	0,718 (**) p = 0,000	-0,444 (**) p = 0,000
Возраст на почнување со терапија	-0,345 (**) p = 0,001	0,087 p = 0,427	/	-0,196 p = 0,067	0,081 p = 0,452	-0,120 p = 0,249	-0,218 (*) p = 0,037	-0,204 p = 0,079	0,203 p = 0,062	-0,273 (**) p = 0,009
Иниц. доза на LT4 ( $\mu\text{g/TT}$ )	0,622 (**) p = 0,000	-0,537 (**) p = 0,000	-0,196 p = 0,067	/	-0,290 (**) p = 0,008	0,611 (**) p = 0,000	0,546 (**) p = 0,000	0,508 (**) p = 0,000	-0,604 (**) p = 0,000	0,534 (**) p = 0,000
TSH на 1 месец (mIU/L)	0,150 p = 0,160	-0,206 p = 0,063	0,081 p = 0,452	-0,290 (**) p = 0,008	/	0,151 p = 0,155	0,155 p = 0,152	0,249 (*) p = 0,035	-0,082 p = 0,465	0,100 p = 0,359
Доза на LT4 на 1 год. ( $\mu\text{g/TT}$ )	0,611 (**) p = 0,000	-0,581 (**) p = 0,000	-0,120 p = 0,249	0,611 (**) p = 0,000	0,151 p = 0,155	/	0,771 (**) p = 0,000	0,730 (**) p = 0,000	-0,616 (**) p = 0,000	0,618 (**) p = 0,000
Доза на LT4 на 2 год. ( $\mu\text{g/TT}$ )	0,719 (**) p = 0,000	-0,563 (**) p = 0,000	-0,218 (*) p = 0,037	0,546 (**) p = 0,000	0,155 p = 0,152	0,771 (**) p = 0,000	/	0,862 (**) p = 0,000	-0,750 (**) p = 0,000	0,787 (**) p = 0,000
Доза на LT4 на 3 год. ( $\mu\text{g/TT}$ )	0,725 (**) p = 0,000	-0,584 (**) p = 0,000	-0,204 p = 0,079	0,508 (**) p = 0,000	0,249 (*) p = 0,035	0,730 (**) p = 0,000	0,862 (**) p = 0,000	/	-0,749 (**) p = 0,000	0,753 (**) p = 0,000
T4 при ре-свал. ( $\mu\text{g/dL}$ )	-0,770 (**) p = 0,000	0,718 (**) p = 0,000	0,203 p = 0,062	-0,604 (**) p = 0,000	-0,082 p = 0,465	-0,616 (**) p = 0,000	-0,750 (**) p = 0,000	-0,749 (**) p = 0,000	/	-0,670 (**) p = 0,000
Доза на LT4 при ре-свал. ( $\mu\text{g/TT}$ )	0,632 (**) p = 0,000	-0,444 (**) p = 0,000	-0,273 (**) p = 0,009	0,534 (**) p = 0,000	0,100 p = 0,359	0,618 (**) p = 0,000	0,787 (**) p = 0,000	0,753 (**) p = 0,000	-0,670 (**) p = 0,000	/

\* $p < 0,05$  (светло сиво); \*\* $p < 0,001$  (потемно сиво)

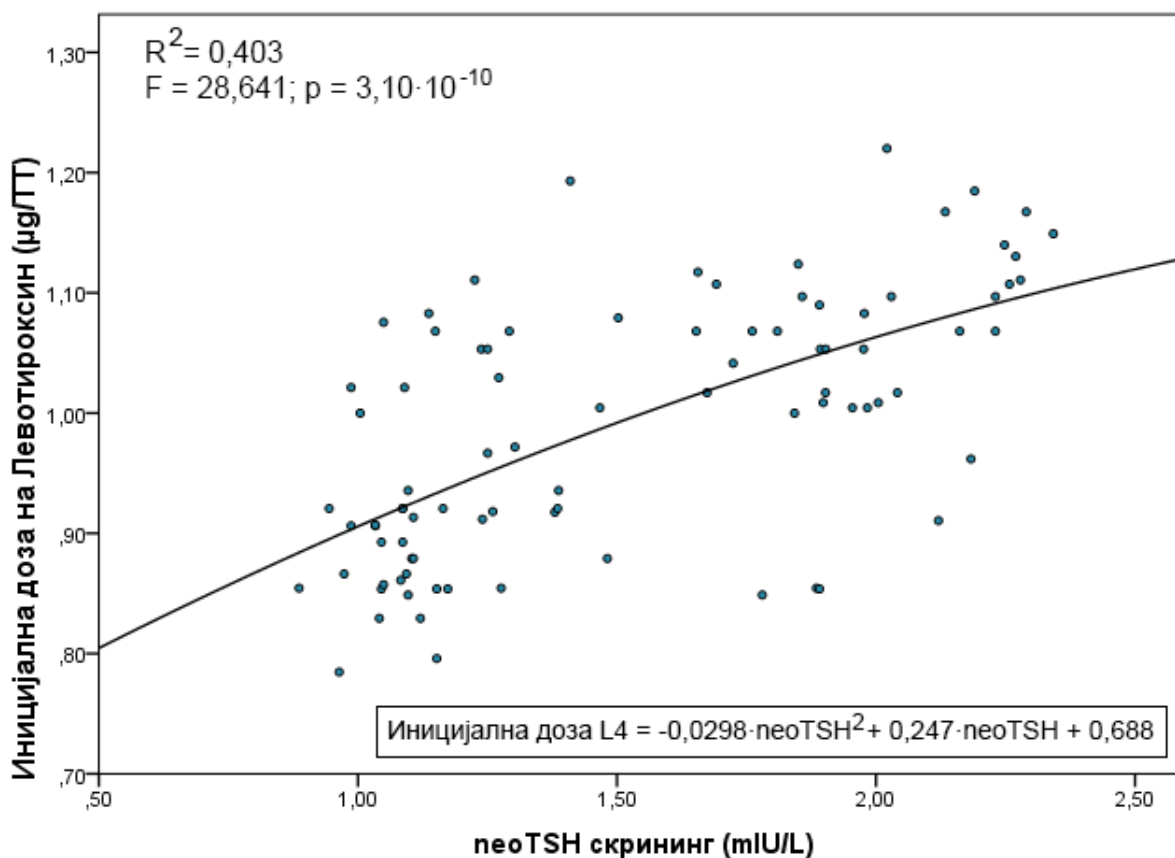
Во оваа студија беа детектирани 33 сигнификантни корелации меѓу проследените варијабли. Од нив 31 корелација беше високо сигнификантна ( $p < 0,001$ ), а 2 корелации беа сигнификантни ( $p < 0,05$ ) и тоа:

- ✓ Иницијалната доза на левотироксин покажа високо сигнификантни корелации со нивоата на TSH на неонатален скринингот (позитивна, умерено силна корелација) и нивоата на серумски T4 (негативна, умерено силна корелација);
- ✓ Нивоата на TSH на 1 месец покажаа негативна, слаба, но статистички значајна корелација со иницијалната доза на левотироксин;
- ✓ Дозата на левотироксин на возраст од 1 година покажа високо сигнификантни корелации со нивоата на TSH на скрининг (позитивна, умерено силна корелација), нивоата на серумски T4 (негативна, умерено силна корелација) и иницијалната доза на левотироксин (позитивна, умерено силна корелација);
- ✓ Дозата на левотироксин на возраст од 2 години покажа високо сигнификантни корелации со нивоата на TSH на неонатален скрининг (позитивна, силна корелација), нивоата на серумски T4 (негативна, умерено силна корелација), иницијалната доза на левотироксин (позитивна, умерено силна корелација) и дозата на левотироксин на 1-ва год. (позитивна, силна корелација);
- ✓ Дозата на левотироксин на возраст од 3 години покажа високо сигнификантни корелации со нивоата на TSH на неонатален скрининг (позитивна, силна корелација), со нивоата на серумски T4 (негативна, умерено силна корелација), иницијалната доза на левотироксин (позитивна, умерено силна корелација), со дозата на левотироксин на 1-ва год. (позитивна, силна корелација), со дозата на левотироксин на 2-ва год. (позитивна, мошне силна корелација), како и сигнификантна позитивна, но слаба корелација со нивоата на TSH на 1 месец;
- ✓ Нивоа на серумски T4 при ре-евалуација покажаа високо сигнификантни корелации со нивоата на TSH при неонатален скрининг (негативна, силна корелација), со нивоата на серумски T4 (позитивна, силна корелација), со иницијалната доза на левотироксин (негативна, умерено силна корелација), со дозата на левотироксин на возраст од 1 година (негативна, умерено силна

корелација), со дозата на левотироксин на возраст од 2 години (негативна, силна корелација) и со дозата на левотироксин на возраст од 3 години (негативна, силна корелација);

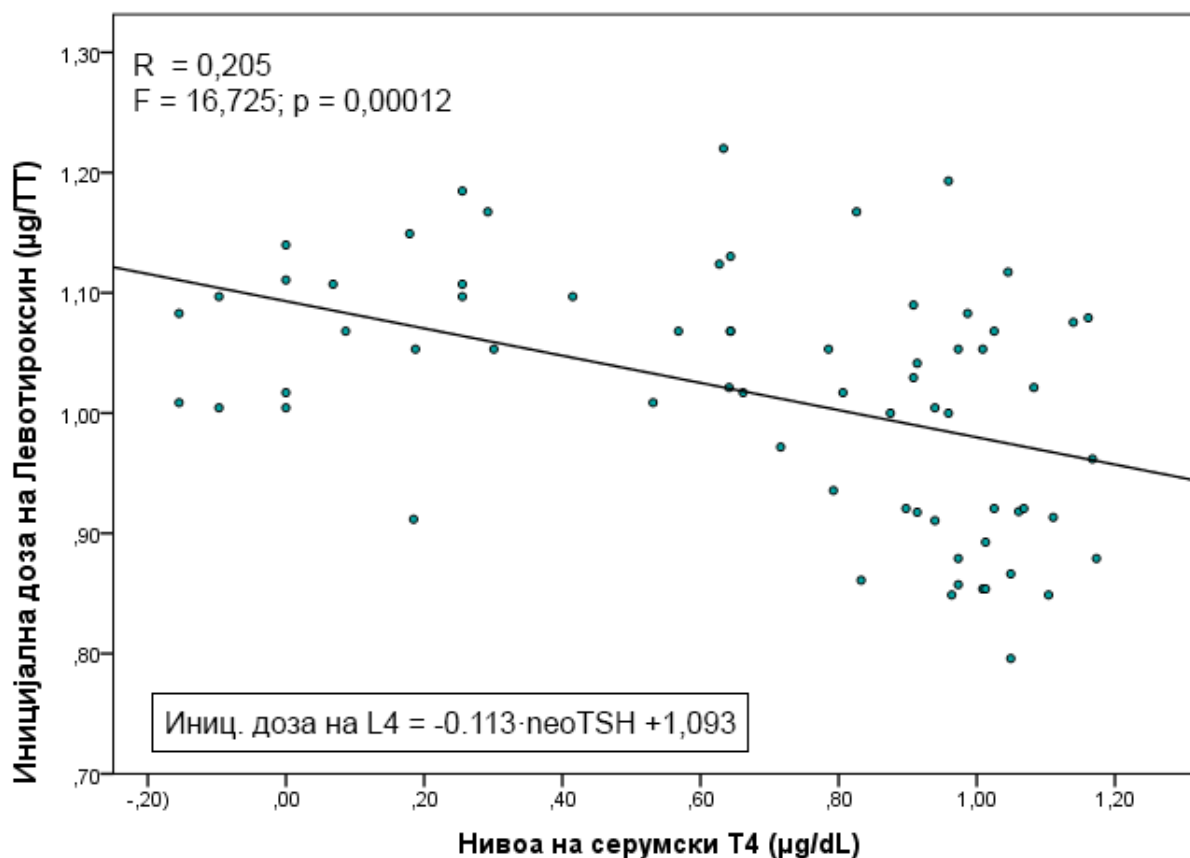
- ✓ Дозата на левотироксин при ре-евалуација покажа високо сигнификантни корелации со нивоата на TSH на неонатален скрининг (позитивна, умерена корелација), нивоата на серумски T4 (негативна, умерена корелација), возраста на почнување со терапија (слаба и негативна корелација), иницијалната доза на левотироксин (позитивна, умерено силна корелација), дозата на левотироксин на 1-ва год. (позитивна, умерено силна корелација), дозата на левотироксин на 2-ра год. (позитивна, силна корелација), дозата на левотироксин на 3-та год. (позитивна, силна корелација) и нивоата на серумски T4 ( $\mu\text{g/dL}$ ) при ре-евалуација (негативна, умерено силна корелација).

Дел од прикажаните синификантни корелации се од особено значење за оваа студија и истите се прикажани и графички, преку биваријантна регресиона анализа. Притоа, на x оската од графикот се поставени независните варијабли, а на y-оската е прикажан одговорот на зависната варијабла. За секоја од регресионите анализи претставена е и формула, за предикција на вредноста на зависната варијабла, во однос на вредноста на независната. Зависноста помеѓу вредноста на TSH на неонатален скрининг со варијаблите: иницијална доза на левотироксин, доза на левоироксин на возраст од 1, 2 и 3 години покажаа најдобро поклопување со користење на нелинеарна регресија, поточно полиномна регресија од втор ред, преку моделирање на функција од типот  $y = ax^2 + bx + c$  (линеарната регресија покажа мала вредност на  $R^2$  вредноста – мерка за јачината на зависноста).



Слика 33. Корелација меѓу вредноста на TSH на неонатален скрининг и иницијалната дијагноза на левотироксин при поставување на дијагнозата на КХ. Како што се забележува зависноста меѓу иницијалната доза и вредностите на TSH на скринингот е позитивна, високо сигнификантна и со умерена јачина ( $R^2 = 0,403$ ), односно секоја повисока вредност на неонаталниот TSH на скрининг, соодветствува со препишување на повисока иницијална доза на левотироксин.

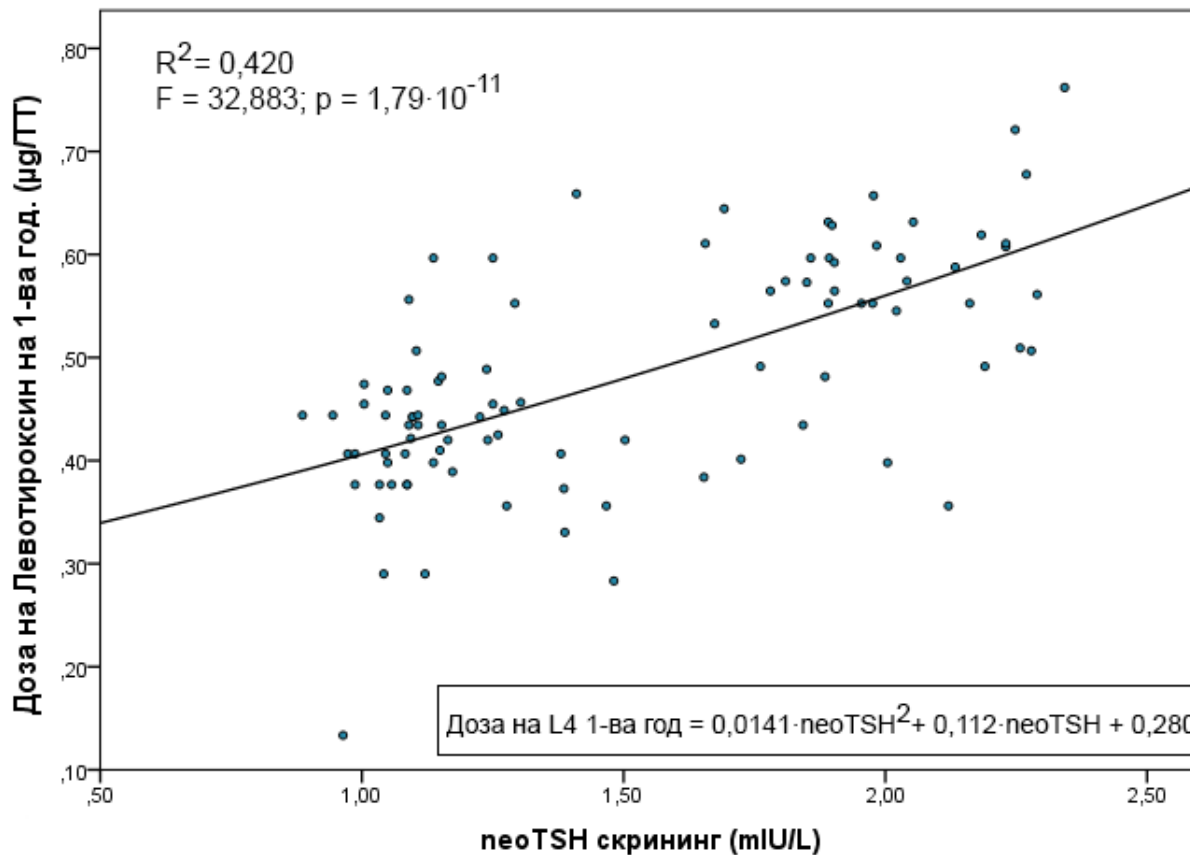
Регресионата анализа помеѓу вредностите на серумскиот T4 и иницијалната доза на левотироксин е претставена на слика 34. За разлика од претходната анализа, оваа анализа покажа линеарна зависност помеѓу двете варијабли, па затоа истата е претставена со линеарна регресија, преку моделирање на функција од типот  $y = kx + n$ .



Слика 34. Корелација помеѓу вредноста на серумскиот Т4 при поставување на дијагнозата на КХ и иницијалната доза на левотироксин.

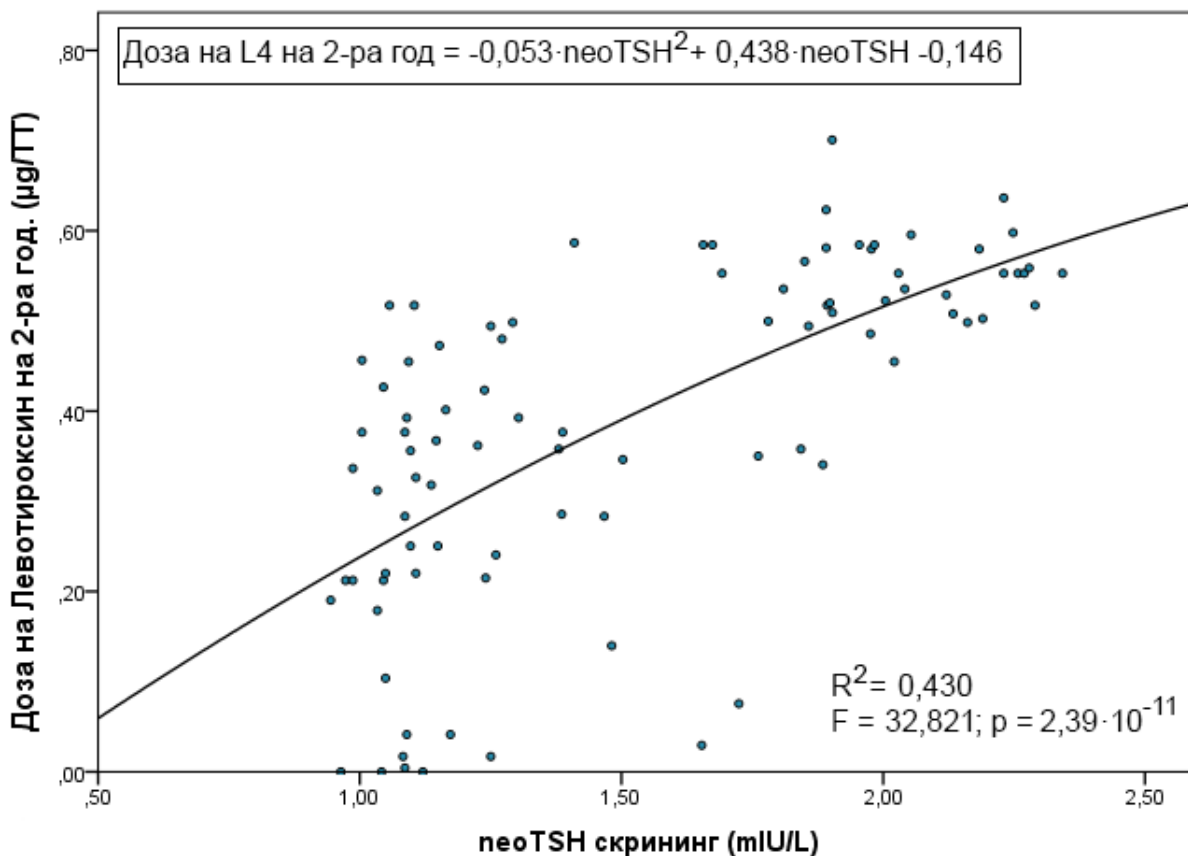
Зависноста меѓу иницијалната доза на левотироксин и вредностите на серумскиот Т4 е *негативна*, високо сигнификантна и со слаба јачина ( $R^2 = 0,205$ ), односно секоја повиска вредност на иницијалниот серумски Т4, соодветствуваше со препишување на пониска иницијална доза на левотироксин.

Корелациите помеѓу терапевските дози на левотироксин на возраст од 1, 2 и 3 години и иницијалните вредности на TSH на неонатален скрининг се претставени на слика 35, 36 и 37. За сите зависности, во самиот дијаграм претставена е и формула која, може да се искористи за предикција на оптималната доза на левотироксин иницијално, и на возраст од една, две и три години во однос на детектираните вредности на неонаталниот TSH.

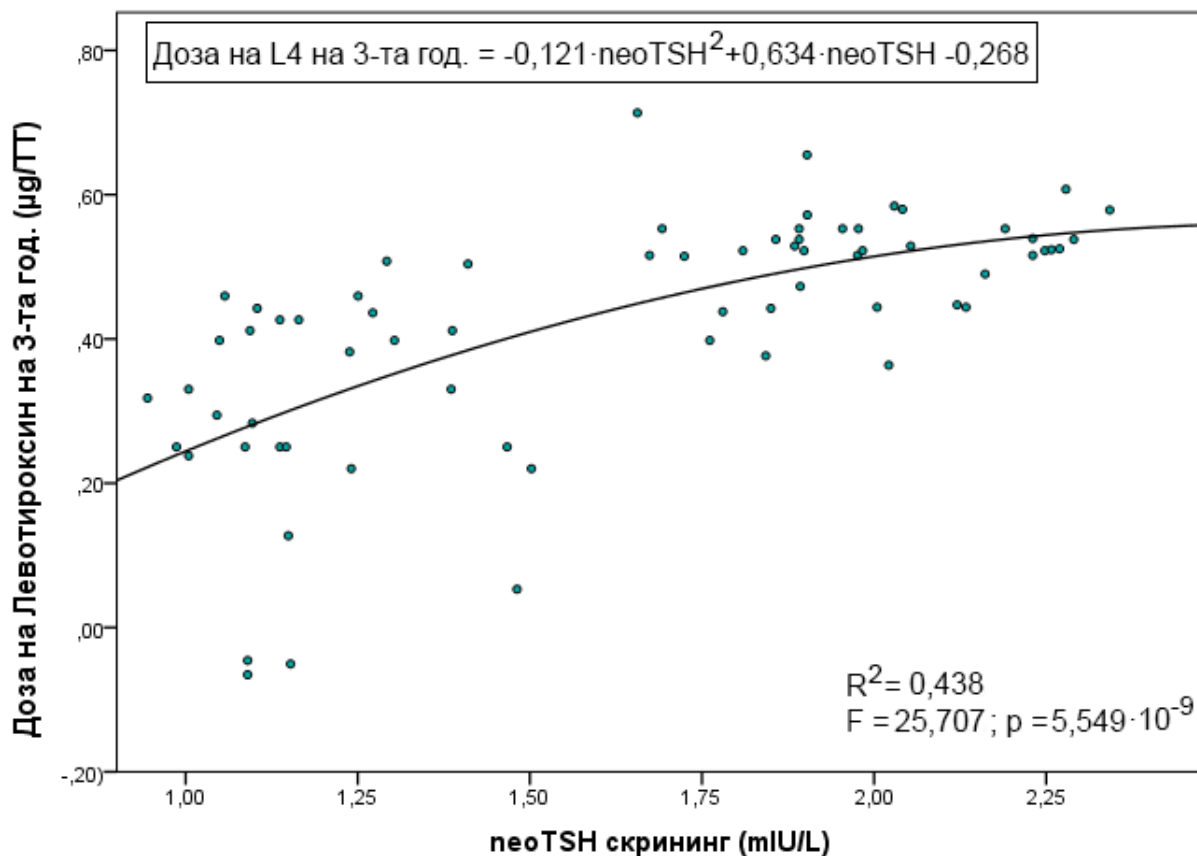


Слика 35. Корелација помеѓу дозата на левотироксин на една година и вредноста на TSH на неонатален скрининг.

Зависноста меѓу дозата на левотироксин на една година и вредностите на TSH на скрининг се покажа позитивна, високо сигнификантна и со умерена силина ( $R^2 = 0,420$ ), односно поголеми вредности за неонаталниот TSH, соодветствува со повисока доза на левотироксин на возраст од една година.



Слика 36. Корелација помеѓу дозата на левотироксин на возраст од 2 години и вредноста на неонатален TSH на скрининг. Зависноста на дозата на левотироксин на возраст од две години и вредностите на TSH на скрининг е позитивна, високо сигнификантна и со умерена јачина ( $R^2 = 0,430$ ), односно повисоки вредности на TSH на скрининг, соодветствува со повисока дози на левотироксин на 2 години.



Слика 37. Корелација помеѓу дозата на левотироксин на возраст од 3 години и вредноста на неонатален TSH на скрининг.

Зависноста меѓу дозата на Левотироксин на 3 годишна возраст и вредностите на TSH на неонатален скрининг е позитивна, високо сигнификантна и со умерена силина ( $R^2 = 0,438$ ), односно повисоки вредности на TSH на скрининг, соодветствува со повисока доза на левотироксин на возраст од три години.

## 7.5 Бинарна логистичка регресија за детерминација на сигнификантни предиктори за развој на транзиторен хипотироидизам

Во рамките на студијата од досегашните статистички анализи беа утврдени сигнификантни разлики кај голем дел од испитуваните варијабли помеѓу пациентите со перманентен, транзиторен и субклинички хипотироидизам. Со цел за утврдување кои од овие параметри можат да послужат како *сигнификантни предиктивни фактори* за развој на транзиторен хипотироидизам (односно *фактори за добра прогноза*), беше спроведена бинарна логистичка регресија, при што сите иницијални биохемиски и клинички варијабли, како и факторите на следење во текот на првите 3 години беа вклучени како независни предиктори за прогнозата. Резултатите се претставени на Табела 25.

Вредностите на TSH на неонатален скрининг како и дозата на левотироксин на возраст од 3 години беа единствените сигнификантни предиктори за развој на транзиторен хипотироидизам, односно поволна прогноза.

За полесна интерпретација, беше извршена *Exp* математичка операција на вредностите на *B* коефициентите со цел да се добијат вредностите на *шансите за развој на добра прогноза* (т.н. **odds ratio, OR**). Нивните вредности како и интервалот на доверба (confidence intervals) за овие вредности се исто така прикажани во табела 24. Како што се забележува, пациентите со вредност на TSH > 40 mIU/L на неонатален скрининг имаат помали шанси за развој на транзиторен хипотироидизам (помала шанса за помножен фактор од 0,0004). Исто така, при секое зголемување на дозата на левотироксин во третата година, шансите за развој на транзиторен хипотироидизам се намалуваат за помножен фактор од 0,0002.

Табела 25. Детерминација на сигнификантни предиктори за развој на транзиторен хипотироидизам

Варијабли	В коефици.	Стандарна грешка (S.E.)	Р вредност	Odds ratio - Exp(B)	95% интервал на доверба за Odds ratio	
					Долна	Горна
Пол	-3,033	2,180	0,164	0,048	0,001	3,450
Начин на породување	4,460	2,632	0,090	86,452	0,497	15028,518
Родилна тежина (g)	0,001	0,003	0,736	1,001	0,995	1,008
Гестациска старост	20,013	40192,934	1,000	491421607	0,000	.
Апгар	3,739	2,250	0,097	42,061	0,511	3461,780
Перинатална историја	-4,731	2,802	0,091	0,009	0,00004	2,141
Фамилијарна историја	-3,538	4,616	0,443	0,029	$3,4 \cdot 10^{-6}$	246,738
Ниво на неонатален TSH на скрининг	-7,866	3,421	<b>0,021 (*)</b>	0,0004	$4,7 \cdot 10^{-7}$	0,313
Серумски TSH	3,242	3,055	0,288	25,589	0,064	10187,427
Нивоа на серумски T4	-0,058	0,301	0,846	0,943	0,523	1,701
Возраст на почнување со терапија (денови)	0,138	0,127	0,277	1,148	0,895	1,472
Иницијална доза на Левотироксин ( $\mu\text{g}/\text{TT}$ )	-0,069	0,578	0,905	0,934	0,301	2,900
Нивоа на TSH на возраст од 1 месец (mIU/L)	0,495	0,226	0,280	1,640	1,054	2,552
Интервали на следење во 1-вата година	-2,959	2,195	0,178	0,052	0,001	3,833
Доза на Левотироксин на 1-ва год. ( $\mu\text{g}/\text{TT}$ )	3,679	2227	0,099	39,602	0,503	3116,736
Доза на Левотироксин на 2-ра год. ( $\mu\text{g}/\text{TT}$ )	2,769	2,496	0,267	15,950	0,120	2127,014
Доза на Левотироксин на 3-та год. ( $\mu\text{g}/\text{TT}$ )	-8,568	3,862	<b>0,027 (*)</b>	0,0002	$9,8 \cdot 10^{-8}$	0,368
Константа	-24,923	40192,936	1,000	$1,5 \cdot 10^{-11}$		

\* $p < 0.05$  (означено со сина боја). Odds ratio – шанси за развој на транзиторен/субклинички хипотироидизам.

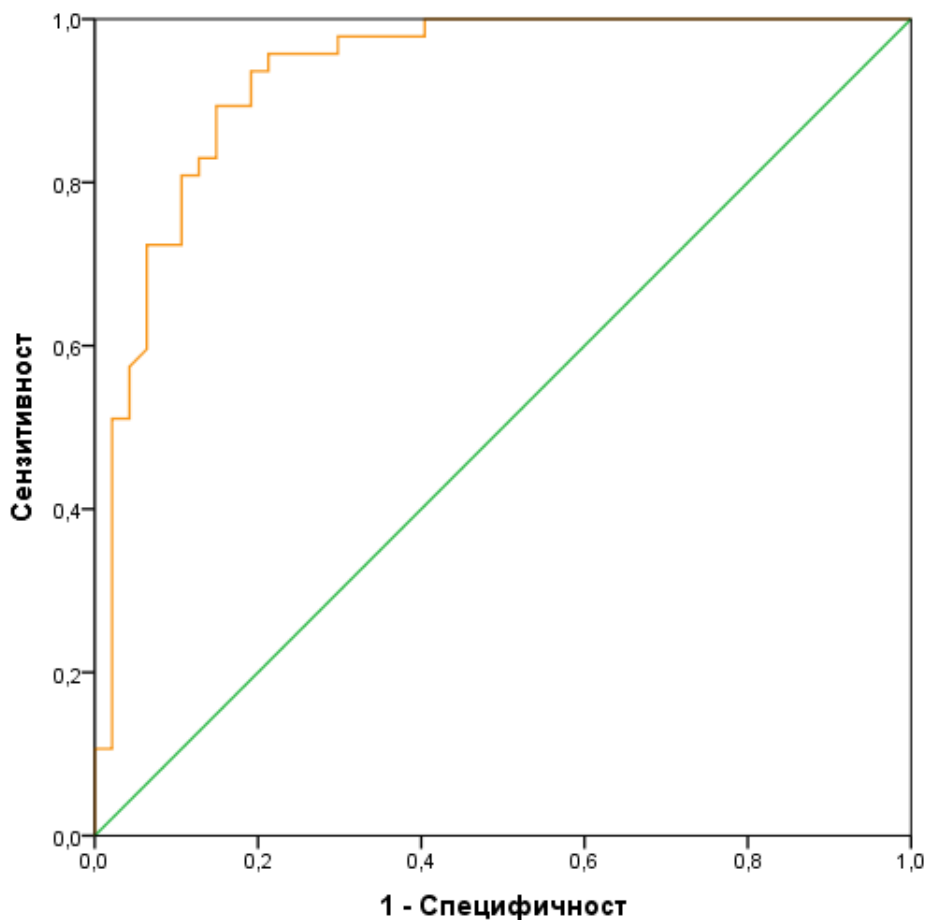
Неколку тестови беа применети со цел да се испита предиктивната моќ на развиениот модел. Врз основа на детерминираниите вредности на веројатноста за одреден пациент да припаѓа во групата на транзитoren хипотироидизам, беа пресметани предвидени припадности кон групите. Притоа, беше одреден процентот на испитаници кои коректно се класифицирани врз база на предложениот модел и процентот на испитаници кои не се коректно класифицирани, како резултат на грешките во класификациска точност на моделот. Предиктивниот модел покажа **мошне висока класификациска точност** со 94,7% сензитивност за прогнозата на транзитoren хипотироидизам и 90,0% специфичност, при што беа детектирани 10% лажно позитивни и 5,3% лажно негативни резултати. Моделот беше карактеризиран со сигнификантно поголема точност на класификацијата на прогнозата (транзитoren наспрема перманентен хипотироидизам) во однос на нулта моделот каде што е вклучена само константата (пораст до 94,7%, во однос на нулта моделот со 66,1% сензитивност,  $\chi^2 = 49,575$ ;  $p = 0.00009$ , Omnibus тест), односно статистичкиот Omnibus тест покажа дека предикциониот модел сигнификантно ја зголемува точноста на класификацијата и подобро се вклопува од нулта моделот кој не ги содржи анализираните независни предиктори. Дополнително, според вредностите за Cox&Snell  $R^2$  и Nagelkerke  $R^2$ , предикторите прикажани во овој модел можат да објаснат 56,8 - 78,7% од варијацијата на класификацијата.

## 7.6 Cutoff вредности

Детерминацијата на cutoff вредностите, како и нивната сензитивност и специфичност за дискриминација меѓу перманентниот и транзитoren хипотироидизам беше извршена преку анализа на Receiver operating characteristic (ROC) кривите.

Како оптимална cutoff вредност за дискриминација меѓу перманентниот и транзитoren хипотироидизам беше детерминирана вредноста на TSH од 31,05 mIU/L на неонатален скрининг, со сензитивност од 93,6% и специфичност од 80,9%, оставајќи

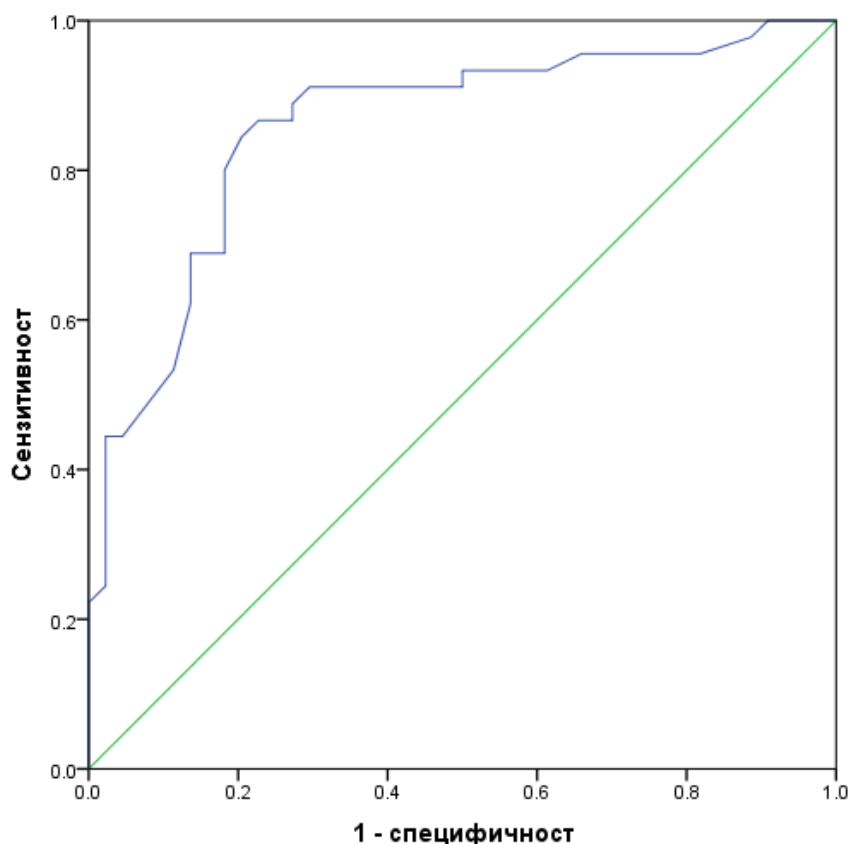
19,1% лажно позитивни и 6,4% лажно негативни резултати ( $AUC = 0,931$ ;  $p = 6,41 \cdot 10^{-13}$ ).  
(Слика 38)



Слика 38. ROC крива за вредноста на неонаталниот TSH одреден на скрининг како предиктивен фактор за дискриминација меѓу перманентен и транзиторен хипотироидизам

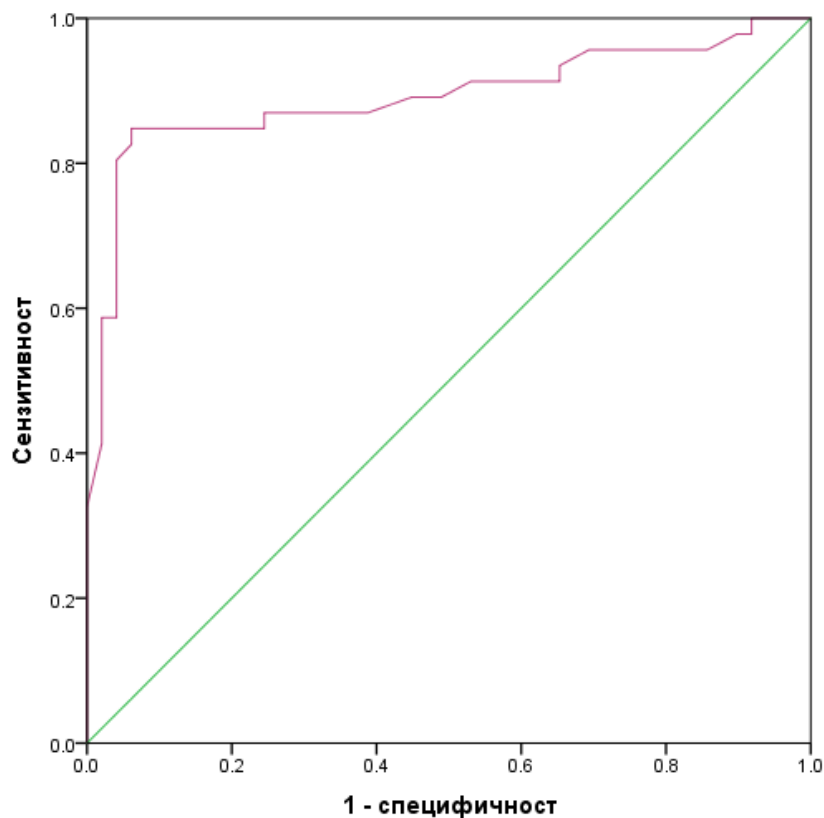
ROC кривата за детерминација на cutoff вредноста за иницијалната доза на левотироксин е прикажана на слика 39. Врз основа на ROC анализата, беше детерминирана cutoff вредност од  $8,475 \mu\text{g/kg}$  за иницијалната доза на Левотироксин како

предиктор за дискриминација помеѓу перманентниот и транзитoren хипотироидизам, со 91,1% сензитивност и 70,5% специфичност и површина под кривата  $AUC = 0,858$  ( $p = 6.099 \cdot 10^{-9}$ ). Врз основа на оваа cutoff вредност, 29,5% од прогнозираните резултати би биле лажно позитивни, односно 9,9% лажно негативни.



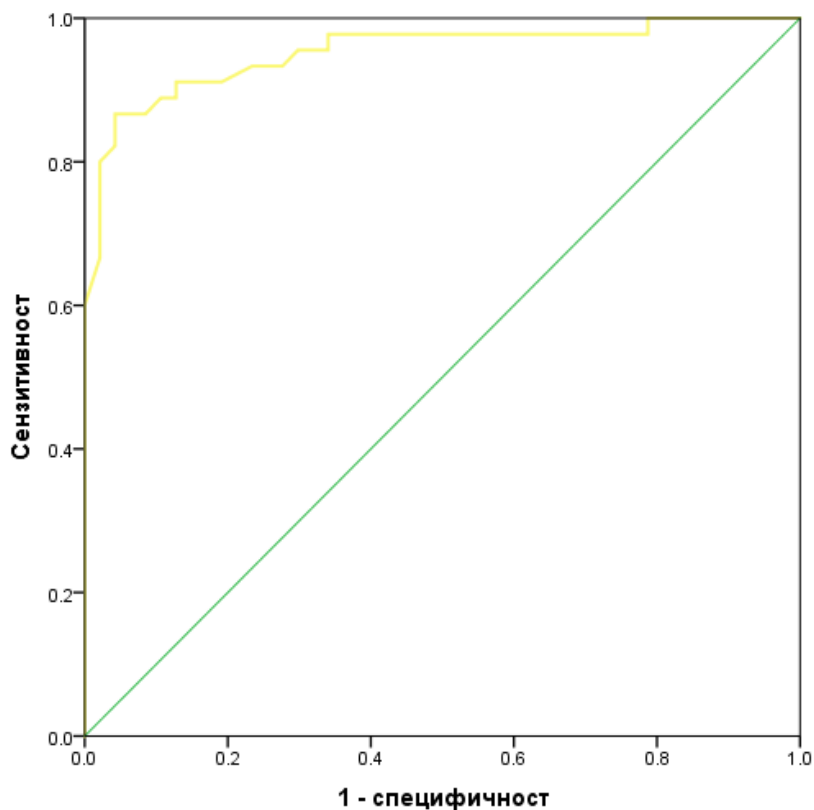
Слика 39. ROC крива за иницијалната доза на левотироксин како предиктивен прогностички фактор за дискриминација меѓу перманентен и транзитoren хипотироидизам

Како cutoff вредност за дозата на левотироксин на возраст од 1 година која може да послужи за дискриминација помеѓу перманентниот и транзитoren хипотироидизам беше детерминирана вредноста  $3,055 \mu\text{g}/\text{kg}$ , со 84,8% сензитивност и 93,9% специфичност и површина под кривата  $AUC = 0,891$  ( $p = 5,35 \cdot 10^{-11}$ ), слика 40. Врз основа на оваа cutoff вредност, 6,1% од прогнозираните резултати би биле лажно позитивни, односно 15,2% лажно негативни.



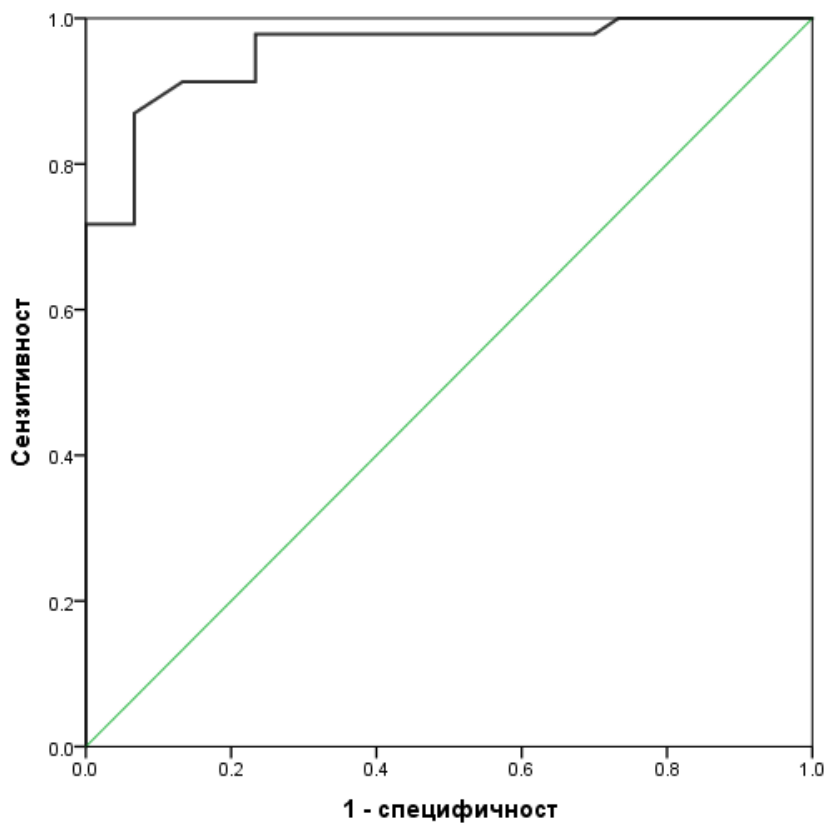
Слика 40. ROC крива за дозата на Левотироксин на возраст од 1 година како предиктивен прогностички фактор за дискриминација меѓу перманентен и транзиторен хипотироидизам

ROC кривата за дозата на Левотироксин на возраст од 2 години укажа на cutoff вредност од 2,585  $\mu\text{g}/\text{kg}$  за дискриминација помеѓу перманентниот и транзиторен хипотироидизам, со 91,1% сензитивност и 87,2% специфичност и површина под кривата  $\text{AUC} = 0,953$  ( $p = 7,50 \cdot 10^{-14}$ ), слика 41. Врз основа на оваа cutoff вредност, 12,8% од прогнозираните резултати би биле лажно позитивни, односно 9,9% лажно негативни.



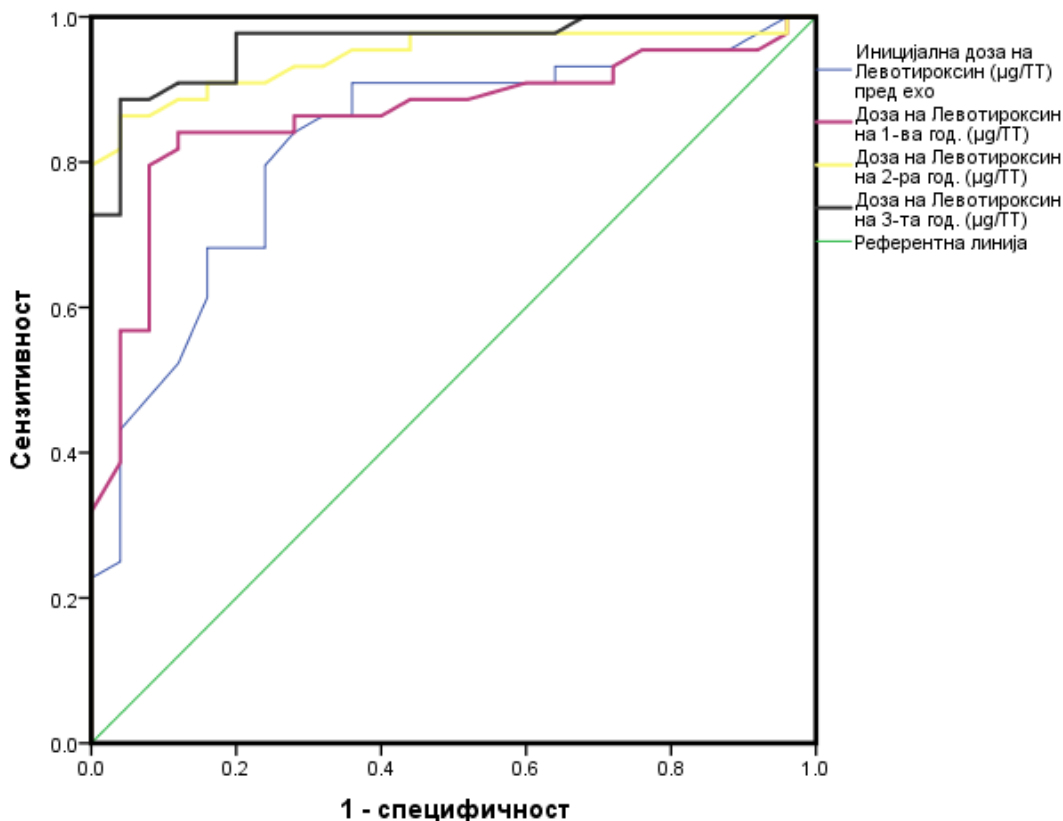
Слика 41. ROC крива за дозата на Левотироксин на 2-рата година како предиктивен прогностички фактор за дискриминација меѓу перманентен и транзитoren хипотироидизам

Како оптимална cutoff вредност за дискриминација помеѓу перманентниот и транзитoren хипотироидизам пак на дозата на Левотироксин на возраст од 3 години беше детерминирана вредноста 2,540  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , со 91,3% сензитивност и 86,7% специфичност и површина под кривата  $\text{AUC} = 0,955$  ( $p = 2,59 \cdot 10^{-11}$ ), слика 42. Врз основа на оваа cutoff вредност, 13,3% од прогнозираните резултати би биле лажно позитивни, односно 8,7% лажно негативни.



Слика 42. ROC крива за дозата на Левотироксин на 3-тата година како предиктивен прогностички фактор за дискриминација меѓу перманентен и транзитoren хипотироидизам

Слика 43 претставува сумарен приказ на ROC кривите за иницијалната доза на Левотироксин, како и дозите на Левотироксин на 1-ва, 2-ра и 3-та година.

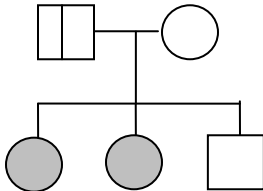
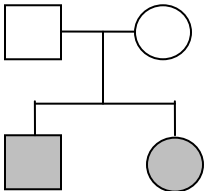
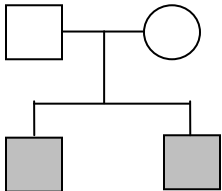


Слика 43. Сумарен приказ на ROC кривите за иницијалната доза на Левотироксин, како и дозите на Левотироксин на 1-ва, 2-ра и 3-та година.

## 7.7 Резултати од генетски анализи

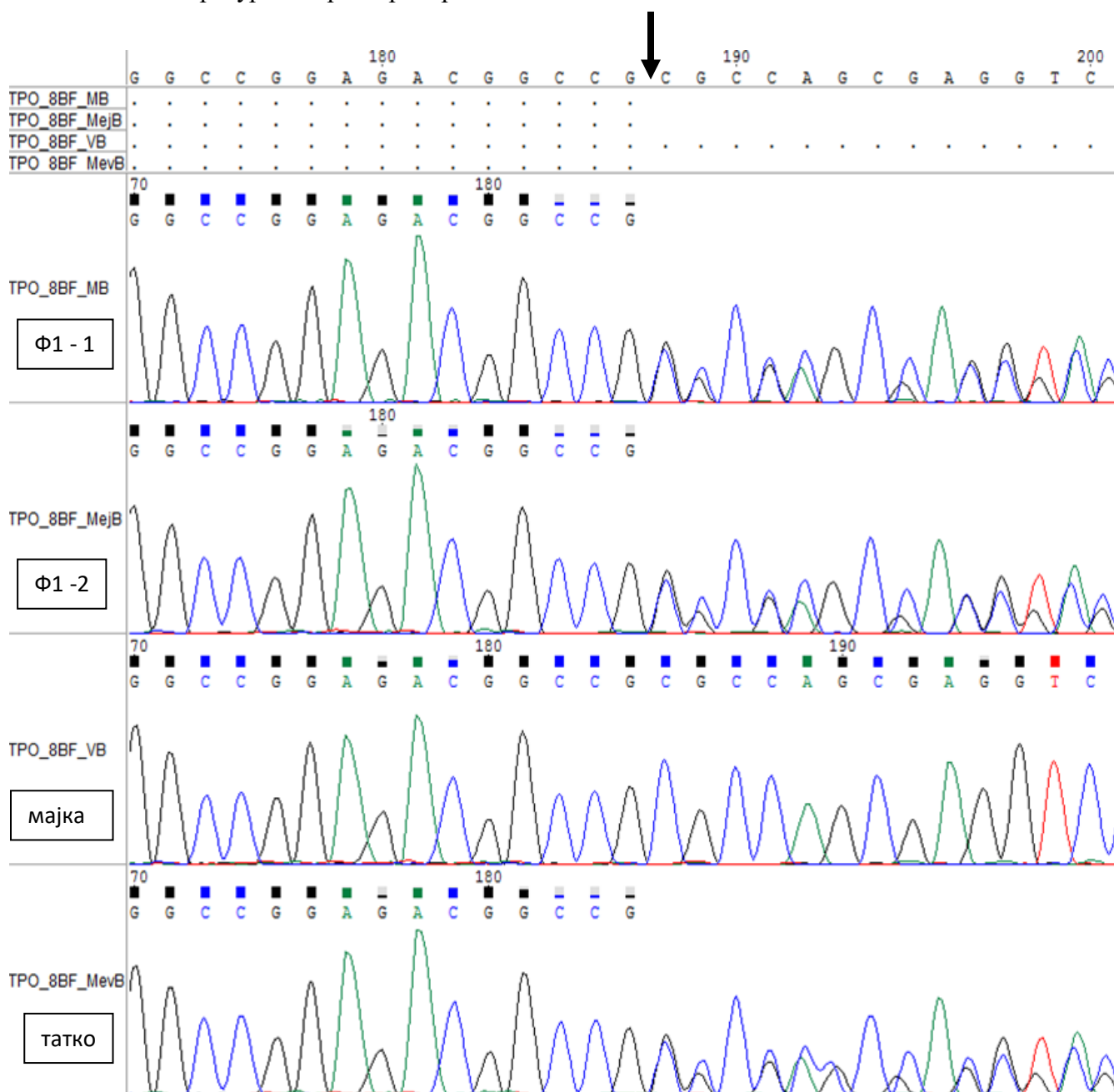
Мултигенетско секвенционирање на кандидатските гени асоцирани со КХ: *TG*, *TPO*, *DUOX2*, *DUOXA2*, *SLC5A5*, *SLC26A4*, *IYD* и *TSHR* беше направено кај 22 пациенти со КХ со еутопична тироиднажлезда, фамилијарни и спорадични случаи асоцирани со перманентен, транзитoren или субклинички фенотип. Резултатите се прикажани во табела 26 и 27.

Табела 26. Приказ на клиничките, биохемиски и молекуларни карактеристики на фамилијарните случаи на КХ

Фамилијарни случаи на конгенитален хипотироидизам						
	<p><b>Ф 1</b></p>  <p>1      2</p>		<p><b>Ф 2</b></p>  <p>3      4</p>		<p><b>Ф 3</b></p>  <p>5      6</p>	
<p><i>TPO</i> c.1187_1188insGCCG p.A397Pfs*76 (хетерозигот)</p>						
	1	2	3	4	5	6
TSH скрининг		190	90	110	30.3	76.7
TSH серум	>75	>75	>75	>75	22.9	41
T4 (ug/dl)	1.02	<1	0.4	<1	9.4	6.2
Доза на L-T4 (ug/kg/day)	11.4	12.5	10.4	11.5	7.6	7.2
Возраст (години)	6	4	16	14	4	2.5
Тироидна ултрасонографија	хиперплазија	Хиперплазија	Хиперплазија со нодули	Нормална жлезда	Нормална жлезда	Нормална жлезда
Дефинитивна дијагноза	П	П	П	П	ПС	ПС
Негативни наоди	TG DUOX2 IYD		TG TPO DUOX2 IYD		DUOX2 DUOXA2 TSHR NIS	

Родословни стебла на случаите со фамилијарен конгенитален хипотироидизам.  
Симболи обоени со сива боја - случаи со хипотироидизам; со средна линија – асимптоматски хетерозиготи; во бела боја - без тироидна болест, ≠ DNA не достапна за тестирање; П-перманентен хипотироидизам, ПС-перзистентен субклинички, Т-транзиторен хипотироидизам

Слика 44. Електроферограм од секвенционирање на двете заболени деца со КХ и нивните родители. Се прикажува присуство на хетерозиготна missence мутација с.1187\_1188insGCCG , р.А397Pfs\*76 во ТРО генот, наследена од таткото, претходно опишана во литература и карактеризирана за патогена.



Табела 27. Клинички карактеристики на спорадичните случаи со КХ анализирани генетски

Бр	Пол	Возраст (год)	TSH (mIU/ml)	T4 ug/dl	L-T4 доза (ug/kg)	Ултрасонографија скен	Исход	Позитивни наоди	Негативни
7	Ж	9	50	12.1	10.5	Нормална големина и фиксација	П, СХ	TSHR c.1516G>A, p.E506K (het) Novel. MAF 0.000008	
	7a Мајка							TSHR c.1516G>A, p.E506K (het)	
	7b Татко							Wild-type	
8	М	4	12.4	13.8	10.5	US-GIS, скен нормална фиксација	П, СХ	TSHR c.692+1_692+4delGTGA (het)	DUOX2, DUOXA2
	8a Мајка							TSHR c.692+1_692+4delGTGA (het)	
	8b Татко							Wild-type	
9	М	9	15.1	13.3	8	Нормална големина и фиксација	Т		DUOX2, DUOXA2, TSHR

10	М	9	13.7	11	8	Нормална големина и фиксација	Т		DUOX2, DUOXA2, TSHR
11	М	5	14.1	11.5	7.5	Нормална ултрасонографија	Т	DUOX2 c.4637A>G, p.E1546G (het)	DUOXA2, TSHR
11a Мајка								Wild-type	
12	М	3	15.7	10.2	8.3	Нормална ултрасонографија	Т		DUOX2, DUOXA2, TSHR, NIS
13	М	5	150	3.1	12.2	Нормална ултрасонографија	П		TG, TPO, DUOX2, IYD, NIS, DUOXA2
14	Ж	7	20.4	6.9	10.5	Нормална ултрасонографија	Т		DUOX2, DUOXA2, TSHR
15	Ж	9	30.3	10.6	10	Нормална големина и фиксација	Т		DUOX2, DUOXA2, TSHR
16	Ж	9	27	10.2	11.3	Нормална големина и фиксација	П		TSHR DUOX2, DUOXA2

17	М	5	57.7	4.4	11.7	Нормална големина и фиксација	П,СХ		TSHR, DUOX2, DUOXA2
18	М	6	18.6	12.1	11.2	Помала жлезда, хипофиксација	П		TSHR
19	М	3	11.9	8.2	8.07	Нормална ултрасонографија			TSHR, DUOX2, DUOXA2
20	М	0	>150	1.04	12.7	Зголемена изоехогена	П	c.31_50dup, p.E17Dfs*77 (het) + c.1313G>A, p.R438H (het)	
	Мајка							c.1313G>A p.R438H (het)	
	Татко							c.31_50dup, p.E17Dfs*77 (het)	
21	Ж	2	16.3		7.14	Нормална ултрасонографија хипоехогена	/		TSHR, DUOX2 DUOXA2
22	М	3	14.7	10.6	6.75	Нормална ултрасонографија	Т		DUOX2 DUOXA2

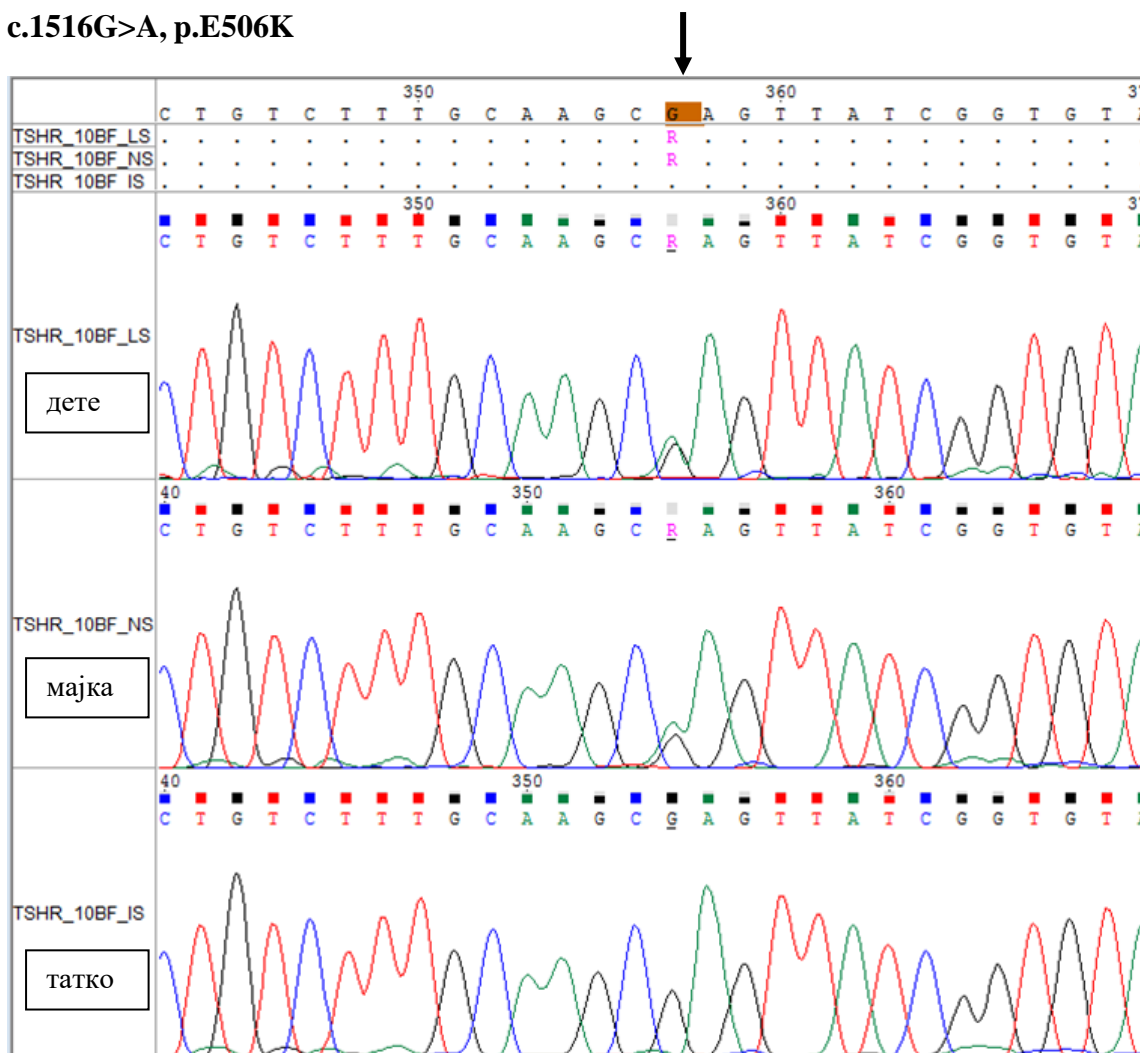
П-перманентен хипотироидизам, Т-транзиторен хипотироидизам, СХ-субклинички хипотироидизам



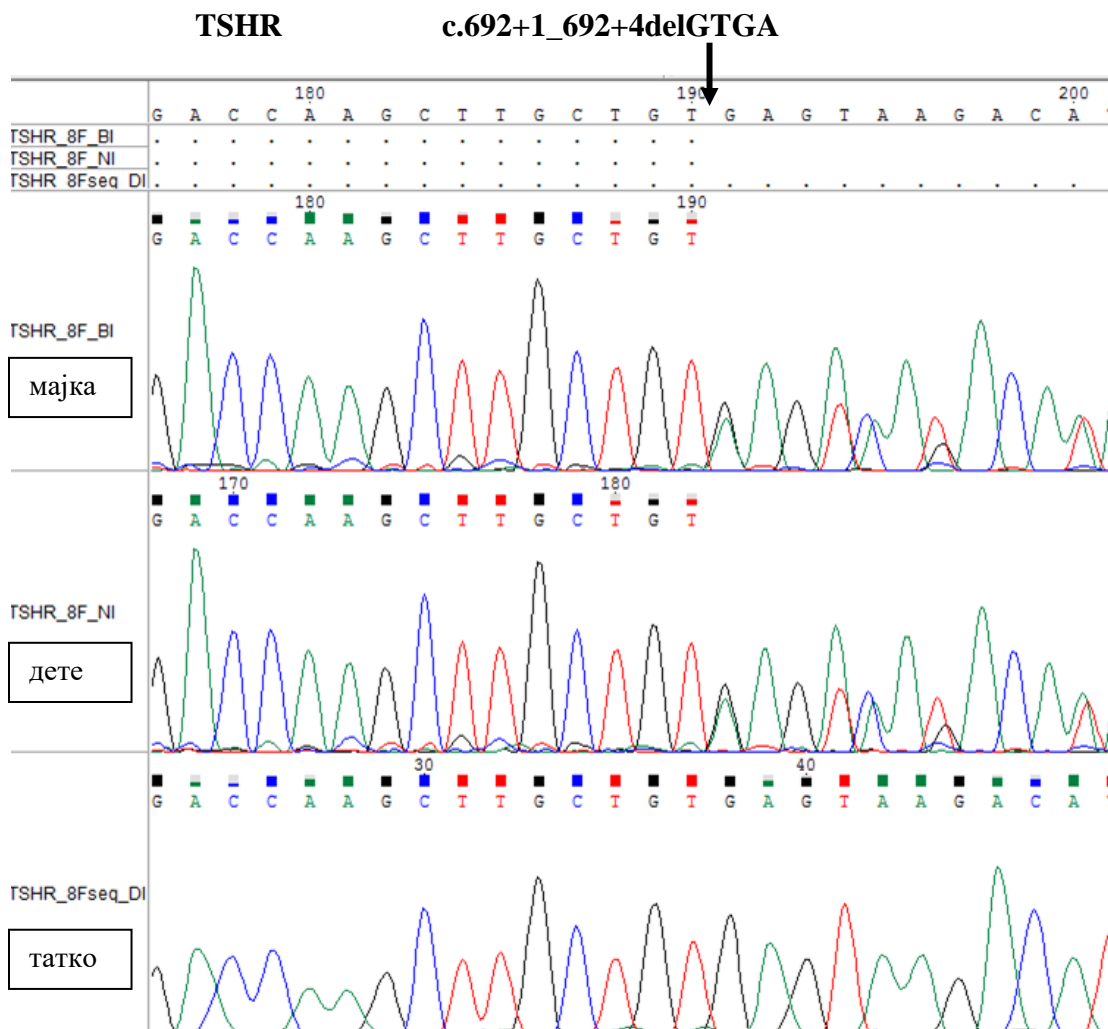
На сликата се претставени две хетерозиготни мутации во ТРО генот с.31\_50dup, р.Е17Dfs\*77, наследена од таткото, која frameshift мутација и с.1313G>А, р.Р438Н misscense мутација наследена од мајката

На слика 46 и 47 се претставени *TSHR* мутациите идентификувани кај спорадичните КХ случаи (бр.7и 8) и нивните родители со Sanger секвенционирање.

**TSHR**  
**с.1516G>А, р.Е506К**

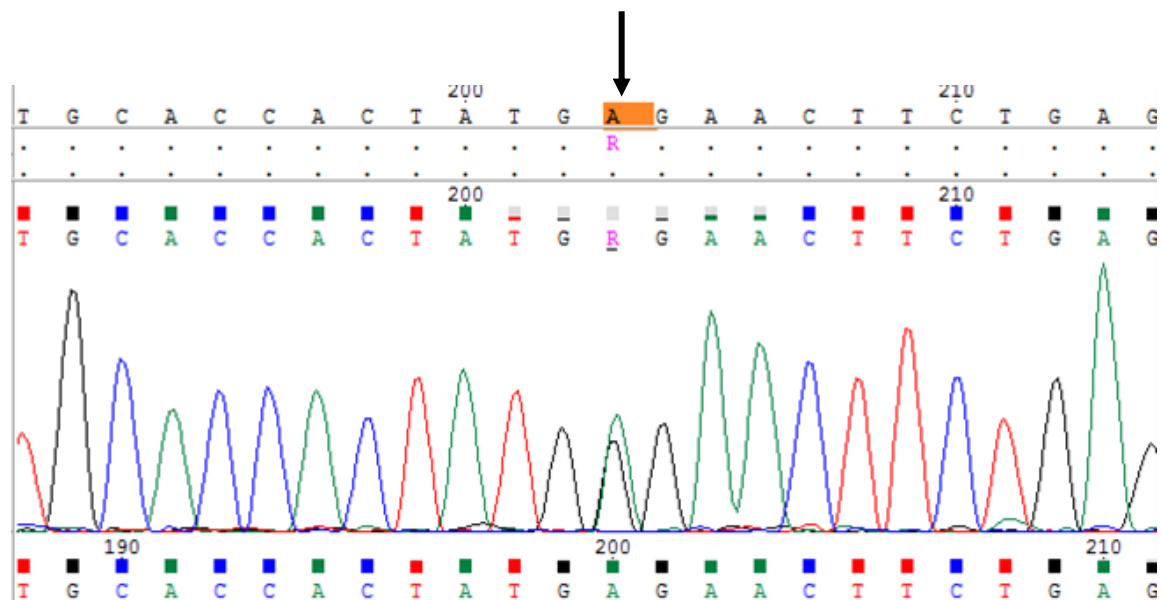


Слика 46. Идентификувана е хетерозиготна misscense мутација во TSHR генот с.1516G>А, р.Е506К, наследена од мајката, која е нова и предивдена како патогена (MAF=0.000008, Exac)



Слика 47. Електроферограм од секвенционирање на TSHR генот кај пациент 8 и неговите родители. Идентификувана е нова хетерозиготна мутација **c.692+1\_692+4delGTGA** наследена од мајката, која претстаува splice site варијација, не е присутна во Exac и нејзиното значење е нејасно

Секвенционирањето на *DUOX2* генот кај пациент бр.11 е претставено на слика 48.



Слика 48. Идентификација на мутација во *DUOX2* генот с.4637A>G, p.E1546G во моноалелна форма, претходно опишана и карактеризирана како патогена. Сегрегационите анализи не потврдија присуство на мутацијата кај мајката на детето, а DNA од таткото не беше достапна за анализа

---

## 8. ДИСКУСИЈА

---

Конгениталниот хипотироидизам претставува најчестата неонатална ендокринолошка болест. Инциденцата на КХ откриен со неонатален скрининг пред 20-тина години изнесуваше 1:3000-4000 новороденчиња, но во сите понови студии од различни региони во светот се известува за континуирано зголемување на инциденцата на КХ и тоа со скоро двојно поголем број на откриени случаи (1:1500 новороденчиња). (83-86) Промената на критериумите во скрининг програмите, како намалувањето на cut-off вредноста на TSH со цел да се зголеми сензитивноста е еден значаен фактор, (87-90), но и се почестите предвремени раѓања, мултипните бремености како резултат на асистираната репродукција, варијациите на внесот на јод или пак изложеноста на хемикалии кои делуваат на ендокриниот систем, се смета дека имаат улога во промената на епидемиологијата на конгениталниот хипотироидизам. (90,91)

Инциденцата на КХ во Македонија изнесува 1:1967 (92,93) и е слична со инциденците во околните земји. (94-96) Во неодамна објавената студија од нашиот центар која го анализираше влијанието на намалувањето на TSH cut-off вредностите на неонатален скрининг на инциденцата на КХ во Македонија, беше утврдено зголемување на инциденцата на КХ од 1:2489 до 2010 година на 1:1585 во периодот потоа, во корелација со намалувањето на TSH cut-off вредностите од 15 на 10 mIU/L по 2010 година. (93)

Италијанската студиска група за неонатален хипотироидизм во 2015 година, објавила голема анализа на националната скрининг програма за КХ во Италија во период од 20 години при што било утврдено зголемување на инциденцата на КХ од 1:3000 на 1:1940 во периодот од 1999-2008, а намалувањето на cut-off вредностите на TSH бил најзначајниот контрибуциски фактор. (86)

Овие епидемиолошки промени на КХ во изминатите години се асоцирани и со промена на вообичаените карактеристики на КХ, односно преминацијата на пореметувањата на тироидната морфогенеза е речиси комплетно заменета со се поголем

број на детектирани случаи со еутопична тироидна жлезда и умерен хипотироидизам, застапени во дури 2/3 од случаите со КХ во студијата на Corbetta и сор. (85)

Во нашата студија кај 43,2% од анализираните случаи со КХ беше визуелизирана еутопична жлезда, со нормална големина и структура на тироидната ултрасонографија, реализирана при поставување на дијагнозата или во доенечкиот период, споредено со претходната студија на Косова и сор. која ги опфаќа пациентите со КХ дијагностицирани до 2013 година каде процентот на пациенти со еутопична тироидна жлезда изнесувал 38,6%. (92) Слични резултати се објавени во студијата на Mitrovic и сор, која претставува детална анализа на КХ во период од 30 години во Централна Србија. (96) Инциденцата на КХ во анализираниот период била триплирана (1:1872 по 2006 година), со двојно зголемување на фреквенцијата на пациенти со еутопична, но и зголемена тироидна жлезда, додека преваленцата на атиреозите била константна. Во студијата на Barry и сор. која претставува анализа на националната скрининг програма во Франција во периодот од 1982-2012 год.и вклучува вкупно 6222 пациенти со КХ, е забележано зголемување на инциденцата, особено на пациентите со еутопична тироидна жлезда и тоа со просечно годишно зголемување од 5.1% (95% CI: 4.3-5.9) без оглед на различните скрининг методологии во различните центри, но и зголемување на тешките форми на КХ асоцирани со еутопична тироидна жлезда (TSH  $\geq$  50: 2.1%; 95% CI: 1.4-2.9), додека инциденцата на тироидните дизгенези била непроменета. (97)

Раното откривање на КХ како и брзата интервенција со цел постигнување на еутиреотична состојба претставуваат два основни услови за оптимален развој кај сите деца со примарен конгенитален хипотироидизам. (98) Покрај раното отпочнување со терапија, другата важна цел кај пациентите со КХ е поставувањето на етиололошката дијагноза, односно утврдување на причината за хипотироидизмот, а со тоа и откривање на случаите на транзиторен хипотироидизам и избегнување на непотребното спроведување на терапија. Етиололошката класификација може да се постави со изведување на неколку иследувања: ултрасонографија, скинтиграфија, мерење на тироеглобулин, тест со перхлоратно отпуштање, молекуларни анализи, но и покрај тоа во одредени случаи

резултатите може да бидат неконклузивни и покрај направен голем број на дијагностички испитувања.

Актуелната студија претставува прва дијагностичка ре-евалуација на пациентите со конгенитален хипотироидизам во Македонија спроведена следејќи стандардизиран протокол. По тестот со прекин на терапијата со левотироксин во просечен период од 30 дена, ја потврдивме хипотезата на студијата, односно кај 30,5% од пациентите беше поставена дијагноза на транзитoren хипотироидизам и терапијата беше трајно прекината. Сепак, во нашата студија перманентниот хипотироидизам беше доминантна форма на КХ застапен во скоро половина од случаите, а 21,1% од пациентите имаа перзистентна хипертиреотропинемија, т.е. вредност на TSH помеѓу 5 и 10 mIU/L, во период најмалку 6 месеци по ре-евалуацијата и беа класифицирани како субклинички хипотироидизам.

**Преваленцата на транзиторниот хипотироидизам** според податоците од литература е многу варијабилна и се движи од 20,0% до 66,5%, првенствено поради различните инклузиони критериуми во различните студии. (76,77,78,99,100,101,102).

Нашите резултати се слични со неколку објавени студии. Во студијата на Kempf и сор. која претставува пресечна анализа на 704 пациенти со КХ детектирани со неонатален скрининг во период од 5 години и третирани левотироксин, кај 38% од случаите терапијата била прекината на возраст од 36 месеци. (76) Во студијата на Eugster и сор. од 33 пациенти кои биле ре-евалуирани по стандардизиран протокол, транзитoren хипотироидизам бил дијагностициран во 36%. Студијата од нашето соседство известува за преваленцата на транзитoren хипотироидизам од 35%. (103) Kang и сор. во студија која опфаќа тригодишна анализа на 105 деца со отстапувања во вредностите на неонаталниот скрининг во Кореја, транзитoren хипотироидизам бил дијагностициран во 35,2% од случаите. (104) Студијата на Rabbiosi и сор. која вклучува 84 пациенти, но исклучиво со присутна еутопична тироидна жлезда, по ре-евалуацијата перманентен хипотироидизам бил присутен во 34,5%, перзистентна хипертиреотропинемија во 27,4% и транзитoren хипотироидизам во 38,1% случаи на КХ. (78) Со оглед на тоа што во нашата студија беа

вклучени сите пациенти со КХ, транзиторниот хипотироидизам би бил почест доколку се анализираат само пациентите со еутопична тироидна жлезда.

Вообичаено, женскиот пол е преобладаан кај пациентите со тироидни агенезии и тироидни дизгенези т.е. кај пациентите со перманентен хипотироидизам.(29)

Кај нашите пациенти со КХ, поголема фреквенција на женскиот пол беше присутна кај перманентниот хипотироидизам, додека пак субклиничкиот хипотироидизам беше сигнификантно позастапен кај машките индивидуи.

Прематуритетот според податоците во литература е често асоциран со појава на транзиторен хипотироидизам.(105-108) Предвремено родените новороденчиња се вулнерабилни кон невноразвојни пореметувања и затоа е неопходно спроведување на терапија дури и кај транзиторните тироидни нарушувања.(105) Lim и сор. анализирале 46 предвремено родени новороденчиња, со многу мала родилна тежина и со хипотироидизам, кај кои тестот со прекин на терапијата на околу 2 годишна возраст бил успешен во повеќе од 90% од случаите, укажувајќи дека тироидните пореметувања кај предвремено родените новороденчиња се најчесто од транзиторен карактер и кај нив е возможна дијагностичка ре-евалуација и пред тригодишна возраст. (109) Слични се резултатите и во студијата на Jung и сор. од 2016 година. (110) Во нашата студија, 11 од пациентите со КХ беа прематурни, но не постоеше сигнификантна разлика во родилната тежина и должината на гестацијата помеѓу пациентите со транзиторен, субклинички и перманентен хипотироидизам. Во студијата на Rabiossi и сор. пак прематуритетот бил асоциран со перманентен хипотироидизам, односно предвремените новороденчиња со вредност на TSH>10 mIU/L на неонатален скрининг имале поголема шанса за развој на перманентен хипотироидизам споредено со терминските новороденчиња, спротивно од поголем број на објавените студии во литература.(78)

Друг фактор може да влијае на појавата на транзиторен хипотироидизам претставува дефицитниот на внес на јод. Светската здравствена организација препорачува проценка на јодниот статус кај популацијата според вредностите на TSH на неонатален скрининг >5mIU/L, односно процент >3% е индикативен за јоден дефицит.(111) Во студијата на Anastasovska и сор. од нашиот центар објавена во 2016 година, е анализиран 13 годишен

период од неонаталниот скрининг, а вредност на  $TSH > 5 \text{ mIU/L}$  е детектирана кај 3,08% од новороденчиња, укажувајќи на јоден суфицит, (112) што претставуваше уште една потврда на претходните сознанија дека јодниот дефицит е елиминиран јавно здравствен проблем во нашата држава. (113) Според тоа, веројатноста за влијанието на варијациите во внесот на јод на транзиториот хипотироидизам во нашата студија беше исклучено.

Исто така транзиториот хипотироидизам не беше асоциран со постоење на тироидна болест кај мајката (анамнестички и лабораториски) во нашата студија, што укажува дека етиологијата на голем процент од случаите со транзиторен хипотироидизам е непозната.

**Субклиничкиот хипотироидизам (CX)**, кој се дефинира со умерено покачена вредност на серумски  $TSH$  ( $5-10 \text{ mIU/L}$ ), со нормална концентрација на тироидни хормони е од особен интерес на авторите во изминативе години. Најчестата етиологија на CX во детската популација и кај адолесцентите е автоимуниот тироидитис, но оваа состојба треба задолжително да се разграничи од субклиничкиот конгенитален хипотироидизам, кој може да се должи на наследни пореметувања, на пример како тироидна дисхормоногенеза или пак  $TSH$  резистенција, односно синдром на тироидна рефрактерност на  $TSH$  стимулацијата, предизвикан од патогени варијации на  $TSH$  рецепторскиот ген ( $TSHR$ ), најчесто присутни во моноалелна форма. (114,115)

Ефектот од терапијата кај умерените субклинички форми на хипотироидизам е дискутабилен, иако таа генерално се препорачува и спроведува барем во првите 2 до 3 години. (116,117) Студијата на Chen и сор. која анализира 204 новороденчиња со субклинички хипотироидизам детектирани на неонатален скрининг во период од 10 години, укажува дека иницијален третман со левотироксин во доза од  $3-5 \mu\text{g/kg}$  е ефективен, односно настанало нормализирање на вредностите на  $TSH$  со високи вредности на  $T4$  по 2-4 недели кај сите испитувани случаи. Сепак, евалуација на растот и развојот е направена само кај 60 пациенти и тоа на возраст од 2 години.

Нашата група на пациенти класифицирани како субклинички хипотироидизам при ре-евалуација, беа детектирани на неонатален скрининг со благо покачени вредности на  $TSH$ , нешто над прифатениот cut-off и тоа медијална вредност  $12,5 \text{ mIU/L}$  ( $IQR = 8,4$ ), а

иницијалната пропишана доза на левотироксин изнесуваше  $8,80 \pm 1,69 \mu\text{g/kg}$ , што е скоро идентично како кај пациентите со дијагноза на транзитoren хипотироидизам, укажувајќи на тоа дека умерениот хипотироидизам на скрининг не секогаш е транзитoren, а врз основа на иницијалните биохемиски карактеристики тоа не може да се предвиди.

Во литературата постојат мал број на студии кои опфаќаат долг период на следење на пациентите со субклинички хипотироидизам.(119,120)

Leonardi и сор. во лонгитудинална студија анализирале 44 новороденчиња во Италија со умерено покачени вредности на TSH на скрининг, од кои кај 19 деца субклиничкиот хипотироидизам перзистирал по просечен период на следење од 5.3 години (4.1-6.6). На возраст од 8 години, субклиничкиот хипотироидизам перзистирал кај 14 деца (31.8%), од кои кај 13 биле најдени структурни или генетски абнормалности на тироидната жлезда. Авторите заклучуваат дека и умерена TSH елевација во неонаталниот период може да означува сериозна анатомска или функционална тироидна абнормалност, а со тоа и ризик за перманентен хипотироидизам.(121)

Во неодамна објавената студија на Tenenbaum-Rakover и сор. е анализиран долготрајниот исход на 27 деца со субклинички хипотироидизам и КХ како резултат на мутации во *TSHR* генот во период до 12 години. Авторите докажале дека CX во хетерозиготна форма е стабилна и компензирана состојба, со адекватно подесена питуитарно-тироидна оска, што не е случај со хомозиготите, со некомплетно компензиран *TSHR* и повремена потреба од спроведување на терапија. (122)

Студијата на Vigone и сор. објавена во 2017 година претставува голема анализа на 34 педијатриски случаи и 18 адултни случаи со позитивни *TSHR* мутации од вкупно 111 регрутирани пациенти со субклинички хипотироидизам. Педијатриските случаи носители на *TSHR* мутации, без оглед на тоа дали бил спроведуван третман или не покажале: нормален раст и невrorазвој, нормални биохемиски параметри и коскената денситометрија во тек на следењето (и до 15 години), што е укажува дека децата со *TSHR* варијации веројатно немаат потреба од терапија, освен доколку се работи за сложени

(compound) хетерозиготи или пак постојат асоцирани ризични состојби за тироидни пореметувања. (123)

Сознанијата од наведените студии ја наметнуваат потребата од секвенционирање на *TSHR* генот во случаите со *CX*, како можна етиолошка причина, застапена во 11-30% од случаите, (124,125) а со тоа адекватна проценка на терапискиот пристап и прогнозата. Во нашата студија беше направено секвенционирање на *TSHR*, *DUOX2* и *DUOXA2* кај пациентите со дијагноза на субклинички хипотироидизам, а *TSHR* мутации беа идентификувани во 30% од случаите. Освен тоа, 3 случаи со тироидната хипоплазија и еден со тироидна ектопија беа асоцирани со субклинички хипотироидизам.

Несомнено, кај сите пациенти со субклинички хипотироидизам без јасна етиологија е неопходно често контролирање на тироидната функција, долг период на следење, како и евентуално изведување на втор ре-евалуациски тест со прекин на терапијата по завршување на пубертетот, што секако ќе ни даде нови информации за прогресијата на тироидната дисфункција и претставува предизвик за нова студија во иднина.

### **Етиологија на перманентниот хипотироидизам**

Перманентниот хипотироидизам во нашата студија во 86% беше резултат на пореметување во тироидната морфогенеза и тоа: атиреоза во 53%, тироидна ектопија во 30% и хипоплазија „in situ “ во 17% од случаите. Според податоците од литература, тироидните дизгенези се причина за *KX* во 80-85%, но со поинаква дистрибуција на подгрупите, односно тироидните ектопии се реферираат како најчесто застапени, во 2/3 од случаите, по што следуваат атиреозите и хипопластичните жлезди. (5,17,26)

Во подгрупата на тироидни ектопии кај нашите пациенти, постоеше изразита преминација на женскиот пол и тоа во однос 3:1 наспроти машкиот пол, согласно со најголем број од студиите во литература. (126-128) Улогата на половиот диморфизам во патогенезата на тироидните дизгенези е анализирана од неколку автори. Eugene и сор. во анализа на 148 деца со *KX* во Канада утврдиле значајни разлики во биохемиските

карактеристики на КХ во однос на полот, односно потежок хипотироидизам при дијагноза бил асоциран со женскиот пол кај тироидната ектопија, а со машкиот пол кај тироидната агенезија, што укажува дека разликите во полот во феталниот период веројатно имаат модулаторна улога на механизмите развојот на тироидната жлезда.(126)

Во студија од Британија со 140 пациенти со КХ, женските деца со тироидна ектопија имале повисоки вредности на неонатален и серумски TSH при дијагноза, но не биле присутни значајни разлики во биохемиските карактеристики помеѓу женскиот и машкиот пол кај пациентите со атиреоза и дисхормоногенеза.(127) Wasniewska и сор. во ретроспективна евалуација на 192 деца со КХ од различни региони во Италија утврдиле дека половиот диморфизам ја зафаќа единствено пренаталната тироидна миграција, односно не биле присутни разлики тежината на хипотироидизмот, ниту пак во потребите од левотироксинска терапија помеѓу женските и машките деца со тироидна ектопија.(128)

Во однос на локализацијата на ектопичното ткиво во нашата студија најчести беа сублингвалната и лингвалната ектопија. Во студијата на Meng и сор. лингвалната ектопија била застапена во 33,7%, а сублингвалната во 27,7% од случаите. (129) Gu и сор. во анализа на 42 пациенти со тироидна ектопија ја опишале следната дистрибуција на ектопични позиции: лингвална во 64%, сублингвална во 17%, двојна тироидеа 12%, останати ретки локализации во 7%. (130) Во студијата на Patil и сор. сублингвалната позиција била најчестата ектопична локализација, присутна во 8 од вкупно 17 анализирани пациенти со тироидна ектопија. (131)

Иницијалните вредности на TSH и T4 сигнификантно се разликуваа помеѓу подгрупите со перманентен хипотироидизам кај нашите пациенти, што е во склад со објавените студии во литература. Тироидните ектопии вообичаено се карактеризираат со тежок хипотироидизам уште при самото раѓање. Во студијата на Perry и сор. само во 2 од 12 случаи вредностите на TSH на скрининг биле во интервал од 15 до 50 mIU/L; додека кај останатите просечната вредност на неонаталниот TSH изнесувала 144 mIU/L. (132)

Во нашата студија беше опсервирана сигнификантна разлика во иницијалните вредности на TSH и помеѓу пациентите со атиреоза и ектопија, која не беше присутна при дијагностичката ре-евалуација, што го потврдува на нивниот сличен клинички тек.

Сепак, кај еден од нашите случаи со ектопична, субментално позиционирана тироидна жлезда, КХ имаше карактеристики на субклинички хипотирозизам. Вредноста на TSH на скрининг изнесуваше 12,3 mIU, иницијалниот серумски TSH 30,9 mIU/L, додека при ре-евалуацијата 7,9 mIU/L, укажувајќи дека пациентите со тироидна дизгенеза презентирани со една форма на тироидна дисфункција може да прогредираат или преминат во друг тип на тироидно нарушување. (133)

Хипоплазија на тироидната жлезда беше застапена во 17% од случаите со тироидна дизгенеза, што е слична со инциденцата во студијата на Karakoc-Aydiner и сор. (72) Податоците за инциденцата на тироидните хипоплазии во литература се различни и изнесуваат од 5 до 26%. (134,135)

Иако, тироидната хипоплазија е евалуирана во исклучително мал број на студии, познато е дека таа претставува најумерената форма на тироидна дизгенеза. (24,26,29) Ова сознание беше потврдено и во нашата студија, односно во 42,8% при иницијалните мерења, и во дури 71,4% при ре-евалуацијата, пациентите со тироидна хипоплазија имаа вредност на TSH <20mIU/L.

Во студијата на Mengreli и сор. структурни абнормалности на тироидната жлезда (хипоплазија „in situ“ или ектопија) биле застапени кај 20% од новороденчињата со вредност на TSH на скрининг само малку повисока од cutoff вредноста (<20 mIU/L). (95) Слични резултати се објавени во студија од Италија, поточно во 19,6% од новороденчињата со вредности на TSH од околу 15 mIU/L била детектирана тироидна дизгенеза (еутопична хипоплазија, хемиагенезија или ектопија). Кај повеќе од половината од овие пациенти со умерено покачени вредности на TSH на скрининг, вредностите на серумскиот TSH при потврда на дијагнозата биле >20 mIU/L, а 19 од вкупно 46 случаи имале тежок хипотирозизам при ре-евалуацијата, со вредности на TSH од 40 до 70mIU/L, сите со присутна хиполастична тироидна жлезда. Како заклучок од овие резултати, авторите потенцираат дека умерено покачена вредност на TSH на скрининг не значи секогаш умерен хипотирозизам при ре-евалуацијата. (69)

Во однос на терапијата, во нашата студија, не постоеше статистички сигнификантна разлика во иницијалната доза на левотироксин и во дозата при ре-евалуација кај

пациентите со тироидна дизгенеза и дисхормоногенеза. Единствено сигнификантни разлики во дозата на левотороксин беа присутни помеѓу пациентите со атиреоза и хипоплазија на возраст од една година ( $p = 0.021$ ), 2 години ( $p = 0.011$ ), и 3 години ( $p = 0.036$ ), што укажува дека пациентите со атиреоза и ектопија имаат слична потреба од левотироксинска терапија, односно ектопичното ткиво дури и да е со поголем волумен е најчесто инсуфициентно и без функционална способност за тироксинска продукција, во споредба со хипопластичната тироидна жлезда која вообичаено има одредена функционална резерва, за продукција на мала, клинички значајна количина на тироидни хормони. (136)

Тироидната дисхормоногенеза беше причина за перманентен КХ во 14% од случаите во нашата студија. Дијагнозата беше поставена со наод на зголемена еутопична тироидна жлезда со хомогена или хетерогена структура при ултрасонографскиот преглед, или скинтиграфскиот наод со зголемена акулулација на радиоизотопот со или без зголемени димензии на тироидната жлезда, со анамнеза за фамилијарна застапеност на КХ или со позитивни наоди од молекуларните анализи. Инциденцата на тироидните дисхормоногенези е во склад со податоците од литература (~15%). (79,137,138)

Сепак во одредени студии известуваат за повисока инциденца на тироидните дисхормоногенези: и тоа 34% во студијата на Dias и сор. во Бразил,(139) односно 42% во студијата на Tamam во Турција (140) и дури 60% во студијата Deeb и сор. во Обединетите Арапските Емирати, (141) воглавно поради високиот степен на консангвинитет.(140,141)

Пациентите со тироидна дисхормоногенеза во нашата студија се карактеризираа со тежок хипотироидизам на раѓање, медијана на неонатален TSH 90,0 mIU/L (IQR = 136,8) со ниски вредности на серумскиот T4, и високи дневни терапевски потреби во тек на следењето (доза на левотироксин на возраст од 3 години:  $3,37 \pm 0,55 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), кои беа скоро идентични како кај пациентите со атиреози и ектопии. Во нашата студија не беше изведен тестот со перхлоратно отпуштање за верификација на јоден органификациски дефект поради достапноста на испитувањето во нашите институции, но беа реализирани генетски анализи за докажување негово докажување. Во студијата Rabiossi и сор. со

перхлоратниот тест биле откриени околу 30% од случаите со тотален или парцијален органификациски дефект, покренувајќи го прашањето за вистинската вредност на испитувањето. Со оглед на изразитата фенотипска варијабилност на овие пациенти како резултат на различната генетска основа, тешко може да се процени кај кои случаи има навистина индикација за изведување на тестот. Авторите сугерираат синтиграфијата со тест со перхлоратно отпуштање да се спроведува единствено во специјализирани центри, со главна цел за таргетирање на понатамошните генетски анализи. (78)

### **Значење на тироидната ултрасонографија и сцинтиграфија за поставување на конечна дијагноза**

*Тироидната ултрасонографија* како неинвазивна, едноставна и достапна имиџинг техника беше широко употребувана кај нашите пациенти уште од неонатална и доенечка возраст. Истата се покажа суфициентна за дискриминација на структурен дефект и нормална или зголемена тироидна жлезда. Ултрасонграфските наоди во нашата студија се разликуваа во 12 случаи со присутна тироидна жлезда при дијагноза и при ре-евалуација, во најголем број првичниот наод беше проценет како тироидна хипоплазија, а потоа беа измерени нормални тироидни димензи. Со помош на ултрасонографијата во 21 случај беше поставена точна дијагноза на тироидна агенезија, додека пак тироидните ектопии не беа визуелизирани со ултразвучниот преглед, односно беа иницијално класифицирани или како агенезија или како тешка хипоплазија.

Всушност главниот недостаток на ултразвучниот преглед, што беше потврдено и во нашата студија претставува неможноста за дијагностицирање на тироидните ектопии. Процентот на детекција на тироидна ектопија со ултрасонографски преглед е различен и изнесува од 0 до 21% во различните студии. (74,142,143)

Ueda и сор. со користење на две базични ултрасонографски позиции и добивање на средна сагитална и задна коронална слика на дното на усната празнина успешно ги детектирале лингвалните тироидни ектопии. (144) Иако овој метод бил применуван и во други студии процентот на детекција на ектопичните жлезди бил низок. (82).

Употребата на колор Doppler ултрасонографијата и како магнетната резонанца како нејонизирачки методи имаат се поголемо значење во дијагностиката на ектопичните тироидни жлезди според голем број автори. (145-147)

Supakul и сор. во студија објавена во 2012 година спровеле ретроспективна анализа на голема кохорта на 124 пациенти со КХ следени во 7 годишен временски период во единствен центар во САД. Авторите ја предлагаат тироидната ултрасонографија како примарен имицинг модалитет кај сите пациенти со КХ, а изведувањето на сцинтиграфијата да биде резервирано само кај мал број пациенти со двојбени наоди. (148)

Во нашата студија, но и во други студии во литература имаше дискоординација во наодите кај тироидните хипоплазии, при дијагноза и при ре-евалуација. Дијагностицирањето на тироидната хипоплазија со ултрасонографски преглед во многу случаи не е едноставно во неонаталната и доенчката возраст, пред се поради малата анатомска површина на вратот каде треба да се изведува прегледот и мерењата, но и поради недостатокот на униформни нормални вредности за волуменот на неонаталните тироидни лобуси. Нормативни вредности на тироидната ултрасонографија се објавени од страна на две групи истражувачи, од Белгија и Германија, (81,149) како и во студијата на Perry со мерења спроведени на 100 здрави новороденчиња во Велика Британија.(82)

*Радиоизотопската сцинтиграфија* претставува стандардна имицинг метода за неонаталниот конгенитален хипотироидизам и е незаменлива за поставување на специфична етиолошка дијагноза на КХ. (72) Постојат различни сугестии за рутинската употребата на технециум 99-т тироидниот скен за утврдување на етиологијата на КХ во неонатална возраст, со оглед на тоа што истата не би го променила терапевтскиот пристап. Одредени студии пак укажуваат дека етиологијата на КХ детерминирана со тироидниот скен има предиктивна улога во одредувањето на тежината на хипотироидизмот и терапијата при понатамошното следење, односно е клинички релевантна. (73,150,151).

Со оглед на извесните разлики детектирани во сцинтиграфските наоди во неонатална возраст и при повторениот скен во понатамошното следење на пациентите во

студијата на Karakoc-Aydiner и сор, авторите сугерираат дека сцинтиграфските наоди се поверодостојни доколку се изведат во покасна возраст.(74)

Две нови, независни студии го анализираат значењето на Tc-99 тироидната сцинтиграфија кај пациентите со КХ со гранични вредности на TSH на неонатален скрининг.(152,153) Студијата на Ghule и сор. покажала дека сцинтиграфскиот наод со ниска или нормална акумулација има предиктивна вредност за перманентен хипотироидизам кај пациентите со вредност на TSH на скрининг помеѓу 6 и 19,9 mIU/L.(152) Спротивно пак, во студијата на Open и сор. која опфаќа поголем број на пациенти податоците добиени од тироидната сцинтиграфија не го предвидувале понатамошниот клинички тек кај пациентите со умерена неонатална хипертиреотропинемија.(153)

Во мултицентрична студија објавена во 2014 година од Lucas-Herald и сор. направена е анализа на дијагностичката и предиктивна вредност поединечно на тироидната ултрасонографија и сцинтиграфија и заедно, т.е. нивна комбинација кај 97 новороденчиња со КХ. Сензитивноста и специфичноста на радиоизотопскиот скен и ултрасонографијата биле: 100%/97% и 100%/55% за ектопија, 81%/100% и 54/100% за атиреоза, и 89%/90% и 80/95% за дисхормоногенеза. Но, со ниту една од овие имиџинг техники поединечно и во комбинација не била поставена дијагноза на еутопична хипопластична жлезда. Авторите укажуваат дека во повеќе од 80% од случаите со позитивен неонатален скрининг може да се постави точна етиолошка дијагноза со комбинација на радиоизотопскиот скен и ултрасонографијата. (154) Недостаток на ултрасонографијата е неможноста за сигурна детекција на тироидните ектопии, додека на сцинтиграфијата е можната појава на лажно негативни наоди, особено доколку се изведе покасно по отпочнување на терапијата кога веќе настапила TSH супресија, при што можно е комплетно отсуство на акумулација на радиотрасерот дури и при присутна еутопична жлезда. (154)

## Компарација помеѓу пациентите со перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам

Разликата во вредностите на неонаталниот и серумскиот TSH при поставување на дијагнозата на КХ беше високо сигнификантна помеѓу трите групи во нашата студија, наметнувајќи се како можен предиктивен фактор. Пациентите со транзитoren и субклинички хипотироидизам имаа пониски вредности на неонатален и серумски TSH во споредба со пациентите со перманентен хипотироидизам. Освен тоа, кај нашите пациенти иницијалните вредности на серумскиот T4 беа повисоки во групите со транзитoren и субклинички хипотироидизам, споредено со перманентниот хипотироидизам, но не се разликуваа сигнификантно помеѓу пациентите со транзитoren и субклинички хипотироидизам. Во објавените студии во литература постојат различни резултати за биохемиските карактеристики на КХ при дијагноза помеѓу перманентниот и транзиторниот хипотироидизам. Во студијата од 2017 година, која претставува анализа на голема кохорта од 731 пациент со КХ во провинција во Кина дијагностицирани во периодот од 2009-2016 година, постоеле високо сигнификантни разлики во иницијалните вредности на TSH и T4 помеѓу пациентите со перманентен и транзитoren хипотироидизам, слично на нашите резултати. (155) Во студиите на Kang и сор. и Messina пациентите со перманентен хипотироидизам се карактеризирале со сигнификантно повисоки иницијалните вредности на TSH во однос на транзиторниот хипотироидизам, но спротивно од нашата студија вредностите на T4/fT4 не се разликувале значајно помеѓу двете групи. (104,156). Во студијата на Rabbiosi не постоеле сигнификантни разлики во хормоналните вредности помеѓу групите, а како главни ризик фактори за перманентен хипотироидизам се идентификувани прематуритетот, тироидната хипоплазија при дијагноза, фамилијарната анамнеза за гушавост/нодули кај прв ред роднини и високите тераписки дози на левотироксин во тек на следењето.(78)

Друга интересна опсервација во нашата студија беше разликата во вредностите на иницијалниот серумски TSH при поставување на дијагнозата и при дијагностичката ре-евалуација, која беше значајна кај пациентите со транзитoren и субклинички

хипотироидизам. Имено, голем процент од пациентите со понатамошен поволен исход на конгениталниот хипотироидизам имаа иницијална вредност на серумскиот TSH > 20 mIU/L, што укажува на значајноста на дијагностичката ре-евалуација.

Според водичите за КХ издадени од ESPE (67) и AAP (157) препорачаната иницијална доза на левотироксин изнесува 10-15 µg/kg, но имајќи ја предвид хетерогеноста на конгениталниот хипотироидизам, некои деца имаат потреба од значително пониска иницијална доза, пред се поради постоењето на одредена ендогена способност за тироксинска продукција.

Во нашата студија терапијата со левотироксин беше иницирана на средна возраст од 14 постнатлни дена, во доза  $10,08 \pm 2,49$  µg/kg, и резултираше со постигнување на еутиреотична состојба кај 91% од пациентите во првиот месец по отпочнувањето со терапија со вредност на медијана на TSH од 2,49 mIU/L. Слично со нашите резултати, во студијата на Uyttendaele и сор. која опфаќа 139 пациенти со КХ дијагностицирани и следени во единствен центар во Белгија во долг временски период (1978-2014), терапијата со левотироксин била отпочната на средна возраст од 11 дена, во иницијална доза од 11.4 µg/kg/ден, а медијаната на TSH на 1 месец изнесувала 3,07 mIU/L.(158) Во својата студија, Vaidyanathan и сор. анализирале дали иницијална доза на левотироксин од 10-12 µg/kg дневно е доволна за постигнување на еутироидизам, а истовремено и избегнување на прекумерен третман. Резултатите од оваа студија покажале дека со иницијална доза на левотироксин од 10-11.9 µg/kg кај вредност на TSH > 100 mIU/L и 8-10 µg/kg кај TSH < 100 mIU/L при поставување на дијагнозата, во најголем број од случаите биле постигнати целните вредности на тироидните тестови на возраст од 1 месец, а прекумерен третман бил присутен почесто при иницијална доза > 12 µg/kg.(159)

Иницијалната доза на левотироксин во нашата студија сигнификантно се разликуваше помеѓу трите анализирани групи, односно кај перманентниот ( $11,64 \pm 2,14$  µg/kg), транзиториот ( $8,29 \pm 1,70$  µg/kg) и субклиничкиот хипотироидизам ( $8,80 \pm 1,69$  µg/kg). Со оглед на тоа што имиџинг испитувањата не беа реализирани во сите случаи при поставување на дијагнозата на КХ, дозирањето кај нашите пациенти воглавно се базираше

на резултатите од тироидните тестови слично како и во студијата на Vaidyanathan и сор. (159)

Hanukoglu и сор. предлага третманот и следењето на пациентите со КХ да се прилагодува според етиологијата на хипотироидизмот, со оглед на различната тежина на хипотироидизмот, но и одговорот на терапијата кои пред се зависат од морфологијата на тироидната жлезда.(151) Во студијата на Mathai и сор. која вклучува 69 пациенти со КХ во Нов Зеланд, иницијалната доза на левотироксин била базирана на етиологијата на КХ, при што тироидната морфологија била одредувана со тироиден скен со технециум, а левотироксинот бил пропишуван во форма на суспензија во болничката аптека, со почести контроли споредено со вообичаената клиничка пракса (во месечни интервали до возраст од 24 месеци). (160) Овој терапевски режим довел до нормализација на вредностите на fT4 во период од 7 дена кај 78% од случаите, односно во 100% во период од 14 дена. Сепак, кај 28% од пациентите биле забележани супрафизиолошки вредности на fT4 и тоа воглавно кај пациентите со висока стартна доза (13-15µg/kg), а повеќе од 80% од пациентите имале потреба од титрирање на дозата во првите 6 недели од отпочнување на терапијата.(160,161)

Студијата на Schoelwer и сор. објавена во 2017 година, претставува анализа на влијанието на таргетираната терапија со левотироксин според тироидната анатомија на потребата од титрирање на дозата во првите шест месеци во тек на следењето. Врз база на наодот од тироидната ултрасонографија препорачаната дневна доза на левотироксин изнесувала 15µg/kg кај атиреоза, 12µg/kg кај тироидна дизгенеза и 10µg/kg кај анатомски нормална жлезда, но се докажало дека таргетираната терапија не ја намалува потребата од титрирање на дозата во доенечка возраст. Освен тоа, авторите укажуваат дека дневната доза на левотироксин од 15µg/kg ги надминува потребите за тироидна супституција кај доенчињата, дури и кај пациентите со атиреози.(162)

Целното дозирање на левотироксинот според лабораториските и имиџинг наоди кај пациентите со КХ секако претставува предизвик за нова проспективна студија во нашиот центар во иднина.

Нашите пациенти беа следени согласно препораките на ESPE, а мониторирањето на тироидната функција беше планирано во период од 1-3 месеци, според индивидуалните тестови на тироидната функција. (67) Кај 42,1% од нашите пациенти имаше потреба од месечни контроли во тек на првата година од животот, најмногу поради промена на дозата на левотироксин или пак поради супресија на TSH ( $TSH < 0.05 \text{ mIU/L}$ ), но интервалите на следење не се разликуваа сигнификантно помеѓу трите дијагностички групи. Во претходно објавена студија од нашиот центар, која претставува пресек на пациенти со КХ дијагностицирани во период од 3 години, тежината на хипотироидизмот на раѓање е детерминирана како предиктивен фактор за фреквенцијата на мониторирањето на тироидната функција во првата година. (163) Во студијата на Valhara и сор. која вклучува 70 пациенти со КХ, 36% имале потреба од месечно следење на тироидната функција на возраст од 6 до 12 месеци, при што иницијалните вредности на TSH и T4 биле значајни предиктивни фактори за месечно следење после 6 месечна возраст. (164) Сепак, следењето на пациентите според иницијалните тироидни тестови е премногу симплифицирано, односно индивидуалниот пристап е неопходен, бидејќи варијациите во вредностите на TSH во тек на следењето се многу чести. TSH претставува најдостапен и веродостоен маркер за тироидниот хормонски статус во централниот нервен систем, па дури и умерена промена во неговата серумска концентрација треба да се сфати сериозно.

По отпочнување со третманот постојат мал број на студии во литературата кои го евалуираат лонгитудинално оптималното дозирање на левотироксинот, односно влијанието на етиологијата на КХ на дневните терапевски потреби. (151,165,166,167) Студијата на Delveschio и сор. претставува мултицентрична опсервациона студија на голем примерок од 216 пациенти со КХ, од 5 големи педијатриски ендокринолошки центри во Италија, која ги анализирала потребите од левотироксинска терапија од раѓањето до 12 годишна возраст во корелација со етиологијата на КХ. Резултатите покажале дека потребите од терапија прогресивно се намалуваат со тек на времето независно од етиологијата на КХ, што беше забележано и во нашата студија. Пациентите со атиреоза и ектопија имале повисока дневна потреба од левотироксин споредено со

пациентите со еутопична тироидна жлезда, а пациентите со атиреоза примале повисока доза споредено дури и со пациентите со ектопија во тек на првите 2 години и на 10 годишна возраст. Дозата на возраст од 6 месеци покажала значајна корелација со понатамошната потреба од левотироксинска терапија како можен предиктивен фактор.(168) Во нашата студија сигнификантна позитивна корелација беше присутна помеѓу иницијалната доза, дозата на возраст од 1, 2 и 3 години и дозата при ре-евалуацијата.

Во тек на следењето кај нашите пациентите беа присутни сигнификантни разлики во дозата на левотироксин во првата година, на возраст од 2 години, на возраст од 3 години и при дијагностичката ре-евалуација помеѓу испитуваните групи. Пациентите со перманентен хипотироидизам имаа значително повиски дневни потреби за левотироксин во споредба со пациентите со транзитoren и субклинички хипотироидизам, што е во склад со голем број на објавени студии во литература.(78,104,156) Не беа присутни разлики во дневните тераписки дози во тек на следењето помеѓу пациентите со транзитoren и субклинички хипотироидизам, ниту пак помеѓу пациентите со транзитoren хипотироидизам ре-евлауирани според протоколот и кај оние каде прекилот на терапија беше направен порано (пред 3 годишна возраст).

### **Предиктивни фактори за појава на транзитoren хипотироидизам**

Во нашата студија вредностите на TSH на неонатален скрининг како и дозата на левотироксин на возраст од 3 години беа единствените сигнификантни предиктори за развој на транзитoren хипотироидизам, односно поволна прогноза кај пациентите со КХ, со мошне висока класификациска точност на предиктивниот модел со 94,7% сензитивност и 90,0% специфичност.

Како оптимална cut-off вредност за дискриминација меѓу перманентниот и транзитoren хипотироидизам беше детерминирана вредноста на TSH од 31,05 mIU/L на неонатален скрининг, (93,6% сензитивност; 80,9% специфичност; AUC = 0,931).

Kang и сор. одредиле идентична cut-off вредност на TSH за дискриминација помеѓу транзиторен и перманентен хипотироидизам. (104) Слични инцијални TSH cut-off вредности биле одредени во студијата на Cho и сор. 28,4mIU/l (157) и во студијата на Lim и сор. 34 mIU/L. (101)

Согласно добиените cut-off вредности, генерално е безбедно да се придржуваме на препораките од адекватните водичи кои препорачуваат отпочнување со третманот веднаш при вредност на TSH > 20mIU/L, односно индивидуален пристап кон случаите кои имаат TSH вредности помеѓу 6 mIU/L и 20 mIU/L. (67)

Освен тоа, дозата на левотироксин на возраст од 3 години беше вториот позитивен предиктор за дијагнозата на транзиторен хипотироидизам.

Како оптимална cutoff вредност за дискриминација помеѓу перманентниот и транзиторен хипотироидизам беше детерминирана доза на левотироксин 2,54 µg/kg на возраст од 3 години, (91,3% сензитивност; 86,7% специфичност; AUC = 0,955).

Голем број на автори ја истакнуваат важноста на дозата на левотироксин како дискриминирачки фактор помеѓу транзиторниот и перманентниот хипотироидизам. (104,156,169,170)

Park и сор. детерминирале дека дозата на левотироксин 2,76 µg/kg на 3-годишна возраст е асоцирана со транзиторен хипотироидизам, со 87,3% сензитивност и 67,6% специфичност, во студија која опфатила 100 пациенти со КХ со еутопична тироидна жлезда во Кореја. (170) Во студијата на Messina и сор. дозата на левотироксин >4,9 µg/kg дневно на возраст од 12 месеци или >4,27 µg/kg дневно на 24 месеци била високо предиктивна за перманентен хипотироидизам, независно од тироидниот ултрасонографски наод, а дозата на левотироксин <2,70; <2,70; и <2,05 на возраст од 1, 2, и 3 години, соодветно, предиктивна за дијагноза на транзиторен хипотироидизам. (156) Слични се резултатите во студиите на Hong и сор. (99) и Unuvar и сор. (100) каде единствена значајна разлика помеѓу пациентите со транзиторен и перманентен хипотироидизам била дозата на левотироксин во тек на следењето, со предикторни вредности на возраст од 2 години од 2,6 µg/kg и 2,2 µg/kg, соодветно. Во студијата на

Cho и сор. вредностите на левотироксин помали од 3,25 µg/kg на возраст од 12 и 24 месеци биле предиктивни за транзитoren хипотироидизам, укажувајќи дека кај овие пациенти е можна и порана ре-евалуација и тоа на возраст помеѓу 12 и 24 месеци.(169)

Кај значителен број од нашите пациенти со транзитoren хипотироидизам терапијата беше прекината пред 36 месечна возраст, а транзиторниот хипотироидизам беше потврден во тек на понатамошното следење. Според тоа, иако не во склад со препораките, ре-евалуацијата со еден месец прекин на терапијата може безбедно да се спорведе на возраст помеѓу 2 и 3 години кај пациентите кои имаат ниски потреби од левотироксинска терапија во тек на следењето.

### Молекуларна карактеризација на пациентите со еутопична тироидна жлезда

Молекуларната основа на конгениталниот хипотироидизам со нормално развиена еутопична тироидна жлезда сеуште не е доволно објаснета. Генетски варијанти во седум гени кои учествуваат во биосинтезата на тироидните хормони (*TG*, *TPO*, *DUOX2*, *DUOXA2*, *IYD*, *SLC5A5* и *SLC26A4*), како и *TSHR* имаат патогенетска улога во одредени случаи. И покрај тоа, генетското анализирање и карактеризирање на КХ со присутна тироидна жлезда е ограничено пред се поради поради недостапноста на секвенционирање на мултипни егзони во рутинската пракса.

Генетските студии на КХ со еутопична тироидна жлезда се доста нови и актуелни, но ограничени бидејќи воглавно вклучуваат или анализа на мал број на гени (пр. *TG*, *TPO*, *TSHR* и *DUOX2*) како во студијата на Jin и сор., (171) или специфично избрани фенотипски случаи, (78,172) или пак анализа на мултипни гени но кај мал број пациенти. (173)

Со развојот на новите молекуларни технологии како next generation секвенционирањето се зголемува секвенциониот капацитет и брзина и се овозможува ефикасно секвенционирање на мултипни гени истовремено. Во новите студии се детектираат се повеќе потенцијално патогени варијанти и тоа кај поголем процент на

пациенти. На пример, во студија од Италија која анализира 11 гени асоцирани со КХ кај 177 пациенти со конгенитален хипотироидизам од било која етиологија, вкупната преваленца на варијации во гените била 58%, а од нив кај пациентите со КХ со еутопична жлезда дури 75%.(174) Исто така голем број на пациенти (28%) имале варијации во неколку гени, (174) што е во склад и со други објавени студии.(171,175,176) Според тоа, јасно отсуство на херeditарност кај КХ би можело да се објасни со конфлуентното дејство на ретки варијации во повеќе гени.(174)

Сепак, оваа скапа молекуларна технологија е достапна само во мал број на светски центри и податоците во литература се ограничени. Нашите резултати фрлија за прв пат во Република Македонија ново светло врз генетските промени кај конгениталниот хипотироидизам.

Во нашата студија генетски беа анализирани и фамилијарни и спорадични случаи на КХ со еутопична тироидна жлезда, со застапеност на перманентна, субклиничка и транзиторна форма на хипотироидизам. Според биохемиските карактеристики на хипотироидизмот кај пациентите беа секвенционирани последователно поединечните каднатски гени. Мутации беа пронајдени кај 7 случаи од 6 различни фамилии и тоа во *TPO*, *TSHR* и *DUOX2* гените. Кај нашите пациенти не беа идентификувани патогени варијации во *DUOXA2*, *IYD*, или *SLC5A5* гените, што е во склад со студиите од литературата кои укажуваат дека овие генетски промени се ретки причинители на тироидна дисхормоногенеза. Исклучок е честата застапеност на *DUOXA2* мутациите кај пациентите од Кореја која изнесувала дури 9% во испитуваната популација од 112 новороденчиња во студијата на (177)

### ***TPO* мутации**

Кај два наши пациенти од фамилијарните случаи, односно кај две сестрички со КХ беше пронајдена мутација во *TPO* генот во хетерозиготна форма. Двете деца се карактеризираат со тежок перманентен конгенитален хипотироидизам со хиперпластична

тироидна жлезда на ултрасонографија. Дијагнозата на КХ кај поголемото дете е поставена во доенечка возраст, со јасни клинички знаци на хипотироидизам, односно кај ова дете не е земен неонатален скрининг поради трансфер од породилиште за оперативен третман на асоцирана конгенитална малформација - дијафрагманлна хернија.

Мутацијата c.1187\_1188insGCCG која беше присутна кај нашите пациенти е претходно опишана во литература и е патогена, односно се смета дека предизвикува голема трункација на протеинот и неговиот пероксидазен домен компромитирајќи ја неговата активност. (178)

Вообичаено пациентите со *TPO* дефекти се хомозиготи или сложени хетерозиготи, но кај нашите случаи мутацијата беше присутна во моноалелна форма и не беа детектирани дополнителни варијации во *TPO* генот. Во литература се опишани класични случаи на тотален јоден органификациски дефект со присутна моноалелна мутација, и тоа дури во 17% од испитуваните фамилии со различно географско потекло.(179,180) Постојат различни објаснувања од авторите за овој феномен, како на пример можни мутации во промоторниот регион, или пак интронски мутации кои создаваат нови сплајсинг места. Друго објаснување е моноалелната тироидна експресија на мутираниот ген, сугерирана од Fuggazola и сор., кој опишува фамилија со три деца со КХ со тироидна дисхормоногенеза кај кои била присутна моноалелна патернална *TPO* мутација во отсуство на транскрипција на матерналните алели на ниво на тироидната жлезда.(181)

Овој механизам на моноалелна тироидна експресија е најверојатно објаснување и за конгениталниот хипотироидизам кај нашите случаи, но истиот не може да се докаже бидејќи за тоа е неопходно тироидно ткиво од пациентите кое не е достапно.

Еден пациент претставуваше compound (сложен) хетерозигот за следните мутации c.31\_50dup/ c.1313G>A.

Мутацијата c.31\_50dup, p.E17Dfs\*77 е опишана и карактеризирана во хомозиготна форма кај пациент со тежок конгенитален хипотироидизам со тотален јоден органификациски дефект во студијата на Vikker и сор. (182) Се работи за дупликација на 20 базни пара, во ATG стартниот кодон (егзон 2), кој генерира frameshift со понатамошен

терминациски сигнал во егзон 3 и комплетно отсуство на синтезата на тироидната пероксидаза. (182)

Мутацијата c.1313G>A, p.R438H, детектирана кај нашиот пациент е за првпат опишана како нова во студијата на Lof и сор. која претставува мултигенетска анализа со next generation sequencing на 34 пациенти со КХ од Финска. (183) Оваа мутација е локализирана во јасен функционален домен на ТРО, а со помош на структурно моделирање на протеинот, се покажало дека мутираниот хистидин на 438 позиција, ги изменува интрамолекуларните интерреакции, односно предизвикува модификација на внатрешната структура на доменот, која што е неопходна за нормална ензимска функција на тироидната пероксидаза. (183)

c.1313G>A мутацијата во хетерозиготна форма беше присутна кај мајката на детето, а мутацијата c.31\_50dup кај таткото, и двајцата со нормална тироидна функција. Според тоа, овие сложени хетерозиготни мутации во ТРО генот се причина за КХ кај нашиот пациент, кој се карактеризираше со тежок хипотироидизам на раѓање, со гушавост, дијагностицирана уште пренатално. Феталната гушавост е ретко опишана состојба во литературата во отсуство на матернална тироидна болест или јоден дефицит и е асоцирана со низа компликации интраутерино. (184)

### ***TSHR* мутации**

Мутации во *TSHR* генот се една од причините за конгенитален хипотироидизам без гушавост или состојба позната како TSH резистенција. Кај најголем број од пациентите со *TSHR* мутации клиничкиот фенотип се вклопува во рамките на опишаната фенотип-генотип корелација, како компензирана и некомпензирана TSH резистенција во зависност од резидуалната рецепторска активност. Вообичаено инактивирачки биалелни мутации предизвикуваат тешка тироидна хипоплазија и тежок хипотироидизам (некомпензирана TSH резистенција), додека кај моноалелните мутации има нормална тироидна жлезда и до одреден степен зачуван капацитет за продукција на тироидни хормони со компензаторно покачување на TSH. (185)

Во нашата група на пациенти со КХ кај кои беа изведени генетски анализи кај два пациенти беа детектирани мутации во *TSHR* генот. И двете деца се спорадични случаи на конгенитален хипотироидизам, односно нема податок за КХ кај останатите членови во семејството. Кај едно дете беше идентификувана нова мутација с.1516G>A (p.E506K) која според предиктивните модели е патогена (MAF=0.000008) и е причина за конгениталниот хипотироидизам. Дијагнозата на КХ кај ова дете беше поставена со јасно покачена серумска вредност на TSH 50 mIU/L, по позитивниот тест на неонатален скрининг, асоцирана со нормална вредност на T4, т.е. компензиран хипотироидизам. Сегрегационите анализи покажа присуство на мутацијата во хетерозиготна форма кај мајката на детето, која имаше уредни тироидни тестови.

Кај вториот пациент е детектирана нова с.692+1\_692+4delGTGA splice site варијација, која не е присутна во ниту една од геномските бази, но нејзиното патогенетско значење не може со сигурност да се утврди. КХ кај ова дете беше од умерен тип, со вредност на TSH на скрининг 12.4 mIU/L, нормална вредност на T4 и нормален ултрасонографски и скинтиграфски тироиден наод.

При дијагностичката ре-евалуацијата и кај двата наши пациенти вредностите на TSH укажуваа на умерена хипертиреотропинемија, при што беше направен обид за прекин на терапијата, но во понатамошното следење, во временски период помал од 6 месеци поради пораст на вредностите на TSH над 15 mIU/L повторно беше индицирано воведување на левотироксинска терапија. Умерениот клинички фенотип на хипотироидизмот кај двата наши случаи е во склад со најголем број од опишаните *TSHR* хетерозиготни мутации во литература. (185)

Преваленцата на *TSHR* мутации кај пациентите со перманентен примарен конгенитален хипотироидизам и во општата популација во Јапонија е испитувана во популационо-генетската студија на Narumi и сор. Од вкупно 102 анализирани пациенти *TSHR* варијации биле идентификувани во 6 случаи, при што биалелните *TSHR* мутации биле присутни кај 4.3% од пациентите со тежок и умерен КХ (TSH >10 mIU/L, по прекин

на терапијата), а моноалелните кај 9.4% од пациентите со умерена хипертиреотропинемија (TSH 5-10 mIU/L). (173)

Во мултиетничка студија објавена во 2016 година направена е опсежна генетска анализа на 8 гени асоцирани со конгенитален хипотироидизам со еутопична тироидна жлезда кај 49 пациенти со КХ од Велика Британија, Оман, Саудиска Арабија, Обединети Арапски Емирати и Турција. Кај само едно дете била пронајдена патогена хетерозиготна *TSHR* мутација, претходно опишана во арапската популација и асоцирана со умерен клинички фенотип на конгенитален хипотироидизам. Нискиот процент на детекција на *TSHR* мутации во ова студија веројатно се должи на големиот процент на консангвинитет кај испитуваните случаи, со што се зголемува веројатноста за појава на биалелни мутации кои во *TSHR* генот би предизвикале хипоплазија на тироидната жлезда, а пациентите со хипопластична тироидна жлезда биле иницијално исклучени од студијата.(175)

Во студија од Кореја со анализа на 4 гени (*DUOX2*, *TPO*, *TSHR* и *TG*) кај 43 пациенти со КХ со еутопична тироидна жлезди биле пронајдени варијации во *TSHR* генот кај 5 пациенти, и тоа кај три од овие пациенти освен мутацијата во *TSHR* генот била пронајдена и моноалелна варијација во *DUOX2* генот, укажувајќи на тоа дека дигенетските, односно оглигогенските промени се една од карактеристиките на КХ со еутопична тироидна жлезда.(171)

Кај нашите два пациенти со *TSHR* мутации, според биохемиските карактеристики на конгениталниот хипотироидизам беше направено секвенционирање и на *DUOX2* и *DUOX2A2* гените, при што не беше најдено отстапување и беше исклучена олигогенска причина за КХ.

### ***DUOX2* мутации**

Во изминативе неколку години се позначајни се покажаа варијациите во *DUOX2* генот кај случаите со тироидна дисхормоногенеза. Метаболниот пат кој го вклучува комплексот *DUOX/DUOX2* задолжен за генерирање на водороден пероксид ( $H_2O_2$ ) е

неопходен за активноста на тироидната пероксидаза и има клучна улога во развојот на тироидната дисхормоногенеза.

Во нашата група на пациенти мутација во *DUOX2* генот беше откриена кај едно дете. Се работи за патогена missense мутација c.4637A>G; p.E1546G која е претходно опишана и карактеризирана.

Студијата на Muzza и сор. објавена во 2013 година претставува најопсежна анализа на мутации во *DUOX2* генот кај голема група на специфично избрани пациенти со КХ, и тоа 26 несродни случаи и два пара близнаци, кои ги исполнувале влезните критериуми, односно постоење на парцијален јоден органификациски дефект.(172) Биле детектирани 16 различни *DUOX2* варијации, а потоа и функционално анализирани за разјаснување на нивното патогенетско влијание. Притоа, за првпат е опишана мутацијата c.4637A>G која беше детектирана и кај нашиот пациент, а не била докажана во контролната група на испитаници без конгенитален хипотироидизам. Ин витро студијата на HeLa клетки која покажала значителна редукција на капацитетот за генерирање на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на мутираниот протеин од 51%, како и високиот степен на конзервација кај афицираните анимални видови несомнено укажува на негова патогенетска улога во појавата на КХ. Пациентот носител на оваа мутација бил сложен хетерозигот, со фенотипски карактеристики на перманентен хипотироидизам. (172)

Кај нашиот пациент мутацијата беше присутна во моноалелна форма и фенотипски се карактеризираше со умерен КХ, односно иницијална вредност на серумскиот TSH 14.1 mIU/L, а терапијата со левотироксин беше спроведувана до возраст од 27 месеци, по што вредностите на TSH останаа во нормални граници и пациентот е класифициран како транзиторен хипотироидизам. Генетската анализа на *TSHR* и *DUOXA2* генот не покажа отстапувања и беше исклучена олигогенетска причина за КХ.

За разлика од нашата студија каде мутација во *DUOX2* генот беше детектирана само во еден случај, студиите во литература известуваат дека *DUOX2* мутациите се најчесто застапените мутации кај пациентите со нормална или зголемена еутопична тироидна

жлезда (41-43%) (171,163) и се асоцирани и со перманентен и со транзитoren хипотироидизам. Широкиот фенотипски спектрум веројатно се должи на останати генетски модификатори, епигенетски фактори, присутни мутации и во други гени или пак етнички разлики, различности во исхраната или фактори од околината.

Peters и сор. анализирале присуство на мутации во *DUOX2* и *DUOXA2* гените кај 40 термински новородени со гранични вредности на TSH на неонатален скрининг (6-20 mIU/ml). Патолошки варијации биле пронајдени во 19 случаи, а 42% од нив имале вредности на TSH скрининг <10 mIU/L. Авторите укажуваат дека прифатените cut off вредности на TSH на неонатален скрининг во одредени случаи не ги откриваат вистинските случаи на тироидна дисхормоногенеза, кои понатаму би развиле најмалку умерен хипотироидизам. Со оглед на тоа, целното секвенционирање на *DUOX2* и *DUOXA2* гените во овие случаи би имало особена дијагностичка важност.(186)

Освен значењето на *DUOX2* мутациите кај пациентите со еутопчна тироидна жлезда, најновите сознанија во литература, по објавените две независни студии од 2017 година, кои детектирале *DUOX2* мутации и кај пациенти со тироидна ектопија, укажуваат на генетска поврзаност на тироидната органогенеза и хормоногенеза. (187,188)

Може да заклучиме дека генетиката на КХ сеуште претставува големо и неразјаснето поле во глобални рамки. Неопходно е продолжување на нашата студија со понатамошни генетски анализи кај поголем број на пациенти со различен клинички фенотип, и секако проширување на анализите во *DUOX2* и *DUOXA2* гените кај сите пациенти со субклинички хипотироидизам, но и кај пациентите со тироидни ектопии.

---

## 9. ЗАКЛУЧОЦИ

---

Со дијагностичката ре-евалуација на пациентите со конгенитален хипотироидизам откриени на неонатален скрининг во нашата студија ги потврдивме двете поставени хипотези: дека постојат деца со КХ кои имаат транзиторен хипотироидизам и немаат потреба од спроведување на доживотна терапија и дека постојат предиктивни фактори за појава на транзиторен хипотироидизам. Од добиените резултати произлегоа следните заклучоци:

- Преваленцата на транзиторен хипотироидизам изнесуваше 30,5% и кај овие деца терапијата со левотироксин беше трајно укината
- Во 21,2% од случаите со КХ по дијагностичката ре-евалуација пациентите имаа умерено покачени вредности на TSH (5-10 mIU/L) во период од најмалку 6 месеци потоа, и кај нив терапијата беше повторно воведена во ниска доза, а беа класифицирани како перзистентна умерена хипертиреотропинемија или субклинички хипотироидизам
- Перманентниот хипотироидизам беше најзастапена форма на конгенитален хипотироидизам во нашата студија присутен во 48,4% од случаите со КХ
- Во однос на етиологијата на перманентниот хипотироидизам во 86% беше резултат на пореметувања на тироидната морфогенеза, а во 14% како резултат на пореметување на тироидната дисхормоногенеза
- Помеѓу тироидните дизгенези, најзастапена беше тироидната агенезија (атиреоза) во 53%, по што следуваа тироидните ектопии присутни во 30% и тироидните хипоплазии во 17% од случаите
- Со комбинацијата на тироидната ултрасонографија и тироидната скинтиграфија успешно беше поставена етиолошката дијагноза на тироидните дизгенези, односно користењето на ултрасонографијата како единствена имиџинг техника се покажа инсуфициентно во дијагностицирањето на тироидните ектопии

- Постоеше сигнификантна разлика во иницијалните вредности на TSH и T4 помеѓу групите на перманентен, транзитoren и субклинички хипотироидизам
- Сигнификантна разлика во биохемиските параметри на хипотироидизмот при дијагноза и при ре-евалуацијата беа забележани кај пациентите со транзитoren и кај субклиничкиот хипотироидизам, со присуство на значаен процент на пациенти со иницијални серумски вредности на TSH>20mIU/L, потенцирајќи го уште еднаш значењето на ре-евалуацијата и тестот со прекин на терапијата
- Пациентите со перманентен хипотироидизам имаа значително повисоки потреби на дневна левотироксинска терапија во тек на следењето, и тоа на возраст од една, две и три години, и при ре-евалуацијата, во споредба со пациентите со транзитoren и субклинички хипотироидизам
- Вредноста на TSH на неонатален скрининг и дозата на левотироксин на возраст од 3 години беа детектирани како единствени позитивни предиктори за појава на транзитoren хипотироидизам, со **мошне висока класификациска точност** на предиктивниот модел со 94,7% сензитивност и 90,0% специфичност
- Како оптимални cut-off вредности за дискриминација помеѓу перманентниот и транзитoren хипотироидизам беа детерминирани следните:
  - вредноста на TSH од 31,05 mIU/L на неонатален скрининг, со сензитивност од 93,6% и специфичност од 80,9%
  - вредност за дозата на левотироксин на возраст од 1 година од 3,055 µg/kg, со 84,8% сензитивност и 93,9% специфичност
  - вредност за дозата на левотироксин на возраст од 2 години од 2,585 µg/kg, со 91,1% сензитивност и 87,2% специфичност
  - вредност за дозата на левотироксин на возраст од 3 години за од 2,540 µg/kg, со 91,3% сензитивност и 86,7% специфичност
- Дијагностичката ре-евалуација со прекин на терапијата и може се изведе пред и 3 годишна возраст, односно помеѓу 2 и 3 години единствено кај пациентите кои одржуваат еутиреотична состојба со ниски дози на левотироксин во следењето, иако не е во склад со препораките од релевантните водичи

- Од вкупно 22 пациенти со еутопична тироидна жлезда кај кои беа направени молекуларни анализи, мутации беа пронајдени во 27% и тоа во *TPO*, *TSHR* и *DUOX2* гените
- Мутациите детектирани во *TPO* генот: c.1187\_1188insGCCG во моноалелна форма, кај две сетрички и c.31\_50dup/ c.1313G>A (compound хетерозигот) кај спорадичен случај на КХ, фенотипски се карактеризираа со тежок конгенитален хипотироидизам со гушавост
- Две нови мутации беа откриени во *TSHR* генот: c.1516G>A и c.692+1\_692+4delGTGA и беа асоцирани со субклинички карактеристики на КХ.
- Во *DUOX2* генот беше детектирана c.4637A>G мутација, во хетерозиготна форма и беше асоцирана со транзиторен хипотироидизам

## ИМПЛИКАЦИИ ВО ПРАКСА И НАСОКИ ЗА ИДНИ ИСТРАЖУВАЊА

Дијагностичката ре-евалуација следејќи го протоколот од нашата студија е ефикасна за дијагностицирање на случаите со транзиторен хипотироидизам и истата би се применувала во клиничката пракса кај сите ново дијагностицирани пациенти со КХ, после 3 годишна возраст, односно на возраст помеѓу 2 и 3 години кај пациентите кои одржуваат еутироидизам со ниски дневни дози на левотироксинска терапија. Со изведувањето на достапните имиџинг техники се поставува точна етиолошка дијагноза што ја одредува понатамошната прогноза и дава насоки за генетските иследувања.

Со тоа, студијата ќе се прошири како во смисла на поголем број на пациенти, но и подолготрајно следење на пациентите со транзиторен и субклинички хипотироидизам.

Освен тоа, генетиката на конгениталниот хипотироидизам претставува исклучително комплексна и сеуште неразјаснета тема. Во нашата студија за првпат во Македонија е направена молекуларна карактеризација на дел од пациентите со КХ. Потребно е проширување на генетските анализи на поголем број пациенти, вклучително и студии со whole exome sequencing кај негативните наоди, се со цел рајаснување на патогенезата на хипотироидизмот.

---

## ЛИТЕРАТУРА

---

1. Fagman H, Nilsson M. Morphogenesis of the thyroid gland. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 323:35-54.
2. Santisteban P. Development of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. In: Braverman LE, Cooper DS, editors. *Werner & Ingbar's the Thyroid: A Fundamental and Clinical Text.* 10th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 4–23.
3. Thorpe-Beeston GJ, Nicolaides KH, Felton CV, et al. Maturation of the secretion of thyroid hormone and thyroidstimulating hormone in the fetus. *N Engl J Med* 1991;324:532–6.
4. Calvo RM, Jauniaux E, Gulbis B, et al. Fetal tissues are exposed to biologically relevant free thyroxine concentrations during early phases of development. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1768–77.
5. De Felice M, Di Lauro R. Minireview: intrinsic and extrinsic factors in thyroid gland development: an update. *Endocrinology* 2011; 152, 2948–2956.
6. Thorpe-Beeston JG, Nicolaides KH, McGregor AM. Fetal thyroid function. *Thyroid* 1992;2(3):207-17.
7. Van Vliet G, Deladoëy J. Disorders of the thyroid and the newborn infant. Section II: Endocrine disorders in neonate. In: Sperling M. *Pediatric endocrinology* 4<sup>th</sup> ed. Elsevier; 2014 p.186-208.
8. Refetoff S, Weiss RE, Usala SJ. The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocr Rev.* 1993;14: 348–399.
9. Chan S, Kilby. Thyroid hormone and central nervous system development. *J Endocrinol.* 2000;165 1–8.
10. Smith DW, Popich G. Large fontanel in congenital hypothyroidism: a potential clue toward earlier recognition. *J Pediatr.* 1972; 80:753–756.
11. Zoeller RT, Rovet J. Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings. *J Neuroendocrinol* 2004;10:809–18.

12. Morreale de Escobar G, Obregon MJ, Escobar del Rey F. Role of thyroid hormone during early brain development. *Eur J Endocrinol.*2004; 151(suppl 3): U25–U37.
13. Bongers-Schokking JJ, de Muinck Keizer-Schrama SM. Influence of timing and dose of thyroid hormone replacement on mental, psychomotor, and behavioral development in children with congenital hypothyroidism. *J Pediatr.* 2005; 147:768–774.
14. Joergensen JV, Oerbeck B, Jebsen P et al. Severe hypothyroidism due to atrophic thyroiditis from second year of life influenced developmental outcome. *Acta Paediatr.* 2005; 94:1049–105.
15. Van der Geyten S, Segers I, Gereben B. et al. Transcriptional regulation of iodothyronine deiodinases during embryonic development. *Mol Cell Endocrinol* 2001;183(1-2):1-9.
16. Di Cosmo C, Fanelli G, Tonacchera M. et al. The sodium-iodide symporter expression in placental tissue at different gestational age: an immunohistochemical study. *Clin Endocrinol (Oxf).*2006; 65: 544–548.
17. Glinoe D. The importance of iodine nutrition during pregnancy. *Public Health Nutr.*2007;10: 1542–1546.
18. Calvo RM, Jauniaux E, Gulbis B, et al. Fetal tissues are exposed to biologically relevant free thyroxine concentrations during early phases of development. *J Clin Endocrinol Metab.*2002; 87:1768–1777.
19. Stewart CJ, Constantatos S, Joolay Y, Muller L. In utero treatment of fetal goitrous hypothyroidism in a euthyroid mother: a case report. *J Clin Ultrasound.*2012; 40: 603–606.
20. Chuang J, Gutmark-Little I, Rose RS. Thyroid Disorders in the Neonate. Section XVI Metabolic and endocrine disorders. In: Fanaroff and Martin’s Neonatal-Perinatal Medicine 2-Volume Set, 10<sup>th</sup> Ed. Elsevier; 2014 p.1491-1515
21. Ares S, Escobar-Morreale HF, Quero J et al. Neonatal hypothyroxinemia: effects of iodine intake and premature birth. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(6):1704-12.
22. Frank JE, Faix JE, Hermos RJ et al. Thyroid function in very low birth weight infants: effects on neonatal hypothyroidism screening. *J Pediatr* 1996;128(4):548-54.
23. Thorpe-Beeston JG, Nicolaidis KH, Snijders RJ, Felton CV, McGregor AM. Thyroid function in small for gestational age fetuses. *Obstet Gynecol* 1991;77(5):701-6

24. Polak M, Szinnai G. Thyroid disorders. In: Rimoin DL, Pyeritz RE, Korf B, editors. Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics. 6th ed. Academic Press; 2013. p. 1–24.
25. Klein AH, Meltzer S, Kenny FM. Improved prognosis in congenital hypothyroidism treated before age three months. *J Pediatr.* 1972;81:912-5.
26. Van Vliet G, Deladoëy J. Hypothyroidism in infants and children: congenital hypothyroidism. In: Braverman LE, Cooper D, editors. *Werner & Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text.* 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2012. p. 790–802.
27. Dussault JH. The anecdotal history of screening for congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(12):4332-4.
28. Clerc J, Monpeyssen H, Chevalier A, Amegassi F, Rodrigue D, Leger FA, Richard B. Scintigraphic imaging of paediatric thyroid dysfunction. *Horm Res.* 2008;70(1):1-13
29. Rastogi MN, LaFrancchi SH. Congenital hypothyroidism. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:17.
30. Deladoëy J, Vassart G, Van Vliet G. Possible non-Mendelian mechanisms of thyroid dysgenesis. *Endocr Dev* 2007;10:29–42.
31. Castanet M, Polak M, Bonaiti-Pellié C, et al. Nineteen years of national screening for congenital hypothyroidism: familial cases with thyroid dysgenesis suggest the involvement of genetic factors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2009–14.
32. Narumi S, Muroya K, Abe Y, et al. Nonclassical TSH mutations as a cause of congenital hypothyroidism in Japan: population based genetic epidemiology study. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:1317–23.
33. Narumi S, Muroya K, Asakura Y, et al. Transcription factor mutations and congenital hypothyroidism: systematic genetic screening of a population-based cohort of Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:1981–5.
34. Lee ST, Lee DH, Kim JY, et al. Molecular screening of the TSH receptor (TSHR) and thyroid peroxidase (TPO) genes in Korean patients with nonsyndromic congenital hypothyroidism. *Clin Endocrinol* 2011;75:715–21.

35. Nicoletti A, Bal M, De Marco G, et al. Thyrotropin-stimulating hormone receptor gene analysis in pediatric patients with non-autoimmune subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:4187–94.
36. Rapa A, Monzani A, Moia S, et al. Subclinical hypothyroidism in children and adolescents: a wide range of clinical biochemical and genetic factors involved. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:2414–20.
37. Calebiro D, Gelmini G, Cordella D, et al. Frequent TSH receptor genetic alterations with variable signaling impairment in a large series of children with nonautoimmune isolated hyperthyrotropinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:E156–60.
38. Mansouri A, Chowhury K, Gruss P. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* 1998;19: 87–90.
39. Narumi S, Yoshida A, Muroya K, et al. PAX8 mutation disturbing thyroid follicular growth: a case report. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96: E2039–44.
40. Al Taji E, Biebermann H, Limanova Z, et al. Screening for mutations in transcription factors in a Czech cohort of 170 patients with congenital and early-onset hypothyroidism: identification of a novel PAX8 mutation in dominantly inherited early-onset non-autoimmune hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 2007;156:521–9.
41. Meeus L, Gilbert B, Rydlewski C, et al. Characterization of a novel loss of function mutation of PAX8 in a familial case of congenital hypothyroidism with in-place, normal-sized thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4285–91.
42. Trueba SS, Augé J, Mattei G, et al. PAX8, TITF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:445–62.
43. Guillot L, Carre A, Szinnai G, et al. NKX2-1 mutations leading to surfactant protein promoter dysregulation cause interstitial lung disease in “Brain-Lung-Thyroid Syndrome”. *Hum Mut* 2010;31:E1146.
44. Carre A, Szinnai G, Castanet M, et al. Five new TTF1/NKX2-1 mutations in brain-lung-thyroid syndrome: rescue by PAX8 synergism in one case. *Hum Mol Genet* 2009;18:2266.

- 
45. Reamon-Buettner SM, Borlak J. NKX2-5: an update on this hypermutable homeodomain protein and its role in human congenital heart disease (CHD). *Hum Mut* 2010;31:1185–94.
46. Van Engelen K, Mommersteeg MTM, Baars MJH, et al. The ambiguous role of NKX2-5 mutations in thyroid dysgenesis. *PLoS One* 2012;7:e52685
47. Knobel M, Madeires-Neto G. An outline of inherited disorders of the thyroid hormone generating system. *Thyroid*. 2003; 13:771-801.
48. Szinnai G, Kosugi S, Derrien C, et al. Extending the clinical heterogeneity of iodide transport defect (ITD): a novel mutation R124H of the sodium/iodide symporter (NIS) gene and review of genotype-phenotype correlations in ITD. *J Clin Endocrinol Metab*.2006; 91: 1199–1204.
49. Banghova K., Al T.E., Cinek O, et al. Pendred syndrome among patients with congenital hypothyroidism detected by neonatal screening: identification of two novel PDS/SLC26A4 mutations. *Eur J Pediatr*.2008; 167:777–783.
50. Grasberger H, Refetoff S. Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dysmorphogenesis. *Curr Opin Pediatr*.2011;23: 421-428
51. Belforte FS, Miras MB, Olcese MC et al. Congenital goitrous hypothyroidism: mutation analysis in the thyroid peroxidase gene. *Clin Endocrinol (Oxf)*.2012;76: 568–576.
52. Caillou B, Dupuy C, Lacroix L, Nocera M, Talbot M, Ohayon R, et al. Expression of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (ThoX, LNOX Duox) genes and proteins in human thyroid tissues. *Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3351–8.
53. Grasberger H, Refetoff S. Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *J Biol Chem* 2006;281:18269–72
54. Vigone MC, Fugazzola L, Zamproni I, Passoni A, Di Candia S, Chiumello G, et al. Persistent mild hypothyroidism associated with novel sequence variants of the *DUOX2* gene in two siblings. *Hum Mutat* 2005; 26:395
55. Pfarr N, Korsch E, Kaspers S, Herbst A, Stach A, Zimmer C, et al. Congenital hypothyroidism caused by new mutations in the thyroid oxidase 2 (THOX2) gene. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 65:810–5.

56. Zamproni I, Grasberger H, Cortinovis F, Vigone MC, Chiumello G, Mora S, Onigata K, Fugazzola L, Refetoff S, Persani L, Weber G. Biallelic inactivation of the dual oxidation maturation factor 2 (DUAXA2) gene as a novel cause of congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93:605-610
57. Targovnik HM, Citterio CE, Rivolta CM. Thyroglobulin gene mutations in congenital hypothyroidism. *Horm Res Paediatr.*2011;75: 11–321.
58. Afink G, Kulik W, Overmars H. et al. Molecular characterization of iodotyrosine dehalogenase deficiency in patients with hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.*2008; 93:4894–4901.
59. Burniat A, Pirson I, Vilain C. et al. Iodotyrosine deiodinase defect identified via genome-wide approach. *J Clin Endocrinol Metab.*2012;97: E1276–E1283.
60. Tajima T, Jo W, Fujikura K, et al. Elevated free thyroxine levels detected by a neonatal screening system. *Pediatr Res.*2009; 66:312–316.
61. Ferrara AM, Onigata K, Ercan O, et al. Homozygous thyroid hormone receptor beta-gene mutations in resistance to thyroid hormone: three new cases and review of the literature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97: 1328–1336.
62. van Mullem A, van Heerebeek, R, Chrysis, D. et al. Clinical phenotype and mutant TRalpha1. *N Engl J Med.*2012; 366: 1451–1453
63. Anzai R, Adachi M, Sho N, et al. Long-term 3,5,3'-triiodothyroacetic acid therapy in a child with hyperthyroidism caused by thyroid hormone resistance: pharmacological study and therapeutic recommendations. *Thyroid.*2012; 22: 1061-1075.
64. Delange F. Neonatal screening for congenital hypothyroidism: results and perspectives. *Horm Res* 1997;48(2):51-61.
65. Bongers-Schokking JJ, de Muinck Keizer-Schrama SM. Influence of timing and dose of thyroid hormone replacement on mental, psychomotor, and behavioral development in children with congenital hypothyroidism. *J Pediatr* 2005;147(6):768-74.
66. Nebesio TD, McKenna MP, Nabhan ZM, Eugster EA (2010). Newborn screening results in children with central hypothyroidism. *J Pediatr.*2010; 156: 990–993.

67. Leger J, Olivieri A, Donaldson M, Torresani T, Krude H, van Vliet G, et al. European Society for Paediatric Endocrinology consensus guidelines on screening, diagnosis, and management of congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:363-84.
68. Ford G, LaFranchi SH. Screening for congenital hypothyroidism: a worldwide view of strategies. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014;28:175-187.
69. Olivieri A, Corbetta C, Weber G, Vigone MC, Fazzini C, Medda E, and The Italian Study Group for Congenital Hypothyroidism. Congenital hypothyroidism due to defects of thyroid development and mild increase of TSH at screening: data from the Italian registry of infants with congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98:140:3-1408.
70. Connelly KJ, Boston BA, Pearce EN et al. Congenital hypothyroidism caused by excess prenatal maternal iodine ingestion. *J Pediatr*. 2012; 161: 760–762.
71. Lenz AM, Root AW. Congenital hypothyroidism: a forgotten clinical diagnosis? *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2008; 21: 623–624.
72. Clerc J, Monpeyssen H, Chevalier A, et al. Scintigraphic imaging of paediatric thyroid dysfunction. *Horm Res* 2008;70(1):1–13.
73. Schoen EJ, Clapp W, To TT, Fireman BH . The key role of newborn thyroid scintigraphy with isotopic iodide (<sup>123</sup>I) in defining and managing congenital hypothyroidism. *Pediatrics* 2004; 114: e683–e688
74. Karakoc-Aydiner E, Turan S, Akpinar I, Dede F, Isguven P, Adal E, Guran T, Akcay T, Bereket A. Pitfalls in the diagnosis of thyroid dysgenesis by thyroid ultrasonography and scintigraphy. *Eur J Endocrinol*. 2012; 166:43 -48.
75. Parazzini C, Baldoli C, Scotti G, Triulzi F. Terminal zones of myelination: MR evaluation of children aged 20-40 months. *Am J Neuroradiol*. 2002;23:1669-1673.

- 
76. Kemper AR, Ouyang LJ, Grosse SD. Discontinuation of thyroid hormone treatment among children in the United States with congenital hypothyroidism: findings from health insurance claims data. *BMC Pediatr* 2010;10:9.
77. Korzeniewski SJ, Grigorescu V, Kleyn M, Young WI, Birbeck G, Todem D, Romero R, Paneth N. Transient hypothyroidism at 3-year follow-up among cases of congenital hypothyroidism detected by newborn screening. *J Pediatr*. 2013;162(1):177-82.
78. Rabbiosi S, Vigone MC, Cortinovis F, Zamproni I, Fugazzola L, Persani L, Corbetta C, Chiumello G, Weber G. Congenital hypothyroidism with eutopic thyroid gland: analysis of clinical and biochemical features at diagnosis and after re-evaluation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(4):1395-402.
79. Gaudino R et al. Proportion of various types of thyroid disorders among newborns with congenital hypothyroidism and normally located gland: a regional cohort study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005; 62(4):444-8.
80. Kapelari K, Kirchlechner C, Högler W, Schweitzer K, Virgolini I, Moncayo R. Pediatric reference intervals for thyroid hormone levels from birth to adulthood: a retrospective study. *BMC Endocrine Disorders*. 2008;8:15
81. Chanoine JP, Toppe V, Lagasse R et al. Determination of thyroid volume by ultrasound from the neonatal period to late adolescence. *European Journal of Pediatrics* 1991; 150r(6): 395–399.
82. Perry RJ, Hollman AS, Wood AM et al. Ultrasound of the thyroid gland in the newborn: normative data. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition* 2002; 87(3): 209–211
83. Shabana W, Peeters E, De Maeseneer M. Measuring thyroid gland volume: should we change the correction factor? *AJR Am J Roentgenol*. 2006;186(1):234-6
83. Harris, K. B., and Pass, K. A. Increase in congenital hypothyroidism in New York State and in the United States. *Mol. Genet. Metab.* 2007; 91:268–277.
84. Deladoey J, Ruel J, Giguere Y, Van Vliet G (2011) Is the incidence of congenital

---

hypothyroidism on the increasing really increasing? A 20-years retrospective population-based study in Quebec. *J Clin Endocrinol Metab* 96:2422–2429

85. Corbetta C, Weber G, Cortinovis F, Calebiro D, Passoni A, Vigone MC, Beck-Peccoz P, Chiumello G, Persani L. A 7-year experience with low blood TSH cutoff levels for neonatal screening reveals an unsuspected frequency of congenital hypo-thyroidism (CH). *Clin. Endocrinol.* 2009;71, 739–745.

86. Olivieri A, Fazzini C, Medda E; Italian Study Group for Congenital Hypothyroidism. Multiple factors influencing the incidence of congenital hypothyroidism detected by neonatal screening. *Horm Res Paediatr.* 2015;83(2):86-93.

87. Krude H, Blankenstein O. Treating patients not numbers: the benefit and burden of lowering TSH newborn screening cut-offs. *Arch. Dis. Child.* 2011;96: 121–122.

88. LaFranchi, S. H. (2010). Newborn screening strategies for congenital hypothyroidism: an update. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33(Suppl. 2), S225–S233.

89. Korada, S. M., Pearce, M., Ward Platt, M. P., Avis, E., Turner, S., Wastell, H., and Cheetham, T. (2010). Difficulties in selecting an appropriate neonatal thyroid stimulating hormone (TSH) screening threshold. *Arch. Dis. Child.* 95, 169–173.

90. Lain S, Trumpff C, Grosse SD, Olivieri A, Van Vliet G. Are lower TSH cutoffs in neonatal screening for congenital hypothyroidism warranted? *Eur J Endocrinol.* 2017 Nov;177(5):D1-D12

91. Persani L. Congenital hypothyroidism with gland *in situ* is more frequent than previously thought. *Front Endocrinol.* 2012 **3**: 18.

92. Kocova M, Anastasovska V, Sukarova-Angelovska E, Tanaskoska M, Taseva E. Clinical practice: experience with newborn screening for congenital hypothyroidism in the Republic of Macedonia - a multiethnic country. *Eur J Pediatr.* 2015 Apr;174(4):443-8.

93. Anastasovska A, Kocova M. Impact of lower screening TSH cutoff level on the increasing prevalence of congenital hypothyroidism. *Int J Neonatal Screen.* 2017; 3(2):007.

- 
94. Loeber JG, Burgard P, Cornel MC, Rigter T, Weinreich SS, Rupp K, Hoffmann GF, Vittozzi L. Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 1 – From blood spot to screening result. *J Inherit Metabol Dis.* 2012; 35(4):603-611.
95. Mengreli C, Kanaka-Gantenbein C, Girginoudis P, Magiakou MA, Christakopoulou I, Giannoulia-Karantana A, et al. Screening for congenital hypothyroidism: the significance of threshold limit in false-negative results. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(9):4283-90
96. Mitrovic K, Vukovic R, Milenkovic T, Todorovic S, Radivojcevic J, Zdravkovic D. Changes in the incidence and etiology of congenital hypothyroidism detected during 30 years of a screening program in central Serbia. *Eur J Pediatr.* 2016;175(2):253-9
97. Barry Y, Bonaldi C, Goulet V, Coutant R, Léger J, Paty AC, Delmas D, Cheillan D, Roussey M. Increased incidence of congenital hypothyroidism in France from 1982 to 2012: a nationwide multicenter analysis. *Ann Epidemiol.* 2016; 26(2):100-105
98. Horn S, Heuer H. Thyroid hormone action during brain development: more questions than answers. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 315:19–26.
99. Hong SY, Chung HR, Lee SY, Shin CH, Yang SW. Factors distinguishing between transient and permanent hypothyroidism in patients diagnosed as congenital hypothyroidism by newborn screening. *J Korean Soc Pediatr Endocrinol.* 2005; 10: 154–160
100. Ünüvar T, Demir K, Abacı A, Büyükgebiz A, and Böber E. The role of initial clinical and laboratory findings in infants with hyperthyrotropinemia to predict transient or permanent hypothyroidism. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2013; 5: 170–173
101. Lim HK, Kim KH, Kim SH, No HY, Kim CJ, Woo YJ. et al. Predictors of transient hypothyroidism in neonatal screening test. *J Korean Soc Pediatr Endocrinol.* 2006; 11: 50–56
102. Zung A, Tenenbaum-Rakover Y, Barkan S, Hanukoglu A, HersHKovitz E, Pinhas-Hamiel O et al. Neonatal hyperthyrotropinemia: population characteristics, diagnosis, management and outcome after cessation of therapy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010; 72: 264–271

- 
103. Eugster EA, LeMay D, Zerlin JM, Pescovitz OH. Definitive diagnosis in children with congenital hypothyroidism. *J Pediatr.* 2004 May;144(5):643-7
104. Kang MJ, Chung HR, Oh YJ, Shim YS & Hwang IT. Three-year follow-up of children with abnormal newborn screening results for congenital hypothyroidism. *Pediatr Neonatol.* 2017; **58**: 442–448
105. Radetti G, Fanolla A, Pappalardo L, Gottardi E. Prematurity may be a risk factor for thyroid dysfunction in childhood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92, 155–159.
106. Chung HR, Shin CH, Yang SW, Choi CW, Kim BI, Kim EK, et al. High incidence of thyroid dysfunction in preterm infants. *J Korean Med Sci* 2009;24:627-31.
107. Bijarnia S, Wilcken B, Wiley VC. Newborn screening for congenital hypothyroidism in very-low-birth-weight babies: the need for a second test. *J Inherit Metab Dis* 2011;34:827-33.
108. Srinivasan R, Harigopal S, Turner S, Cheetham T. Permanent and transient congenital hypothyroidism in preterm infants. *Acta Paediatr* 2012;101:e179-82.
109. Lim G, Lee YK, Han HS. Early discontinuation of thyroxine therapy is possible in most very low-birthweight infants with hypothyroidism detected by screening. *Acta Paediatr.* 2014;103:e123-9.
110. Jung JM, Jin HY, Chung ML. Feasibility of an Early Discontinuation of Thyroid Hormone Treatment in Very-Low-Birth-Weight Infants at Risk for Transient or Permanent Congenital Hypothyroidism. *Horm Res Paediatr.* 2016;85(2):131-9
111. World Health Organization. Assessment of Iodine Deficiency Disorders and Monitoring their Elimination: A Guide for Programme Managers, 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2007.
112. Anastasovska V, Kocova M. Newborn screening for thyroid-stimulating hormone as an indicator for assessment of iodine status in the Republic of Macedonia. *J Med Biochem.* 2016; 35: 385–389.
113. International Council for Control of Iodine Deficiency Disorders. Karanfilski B, Bogdanova V, Vaskova O, Miceva-Ristevska S, Loparska S, Kuzmanovska S. Macedonia begins to monitor

IDD in pregnant and lactating women along with school-age children. IDD Newsletter August 2009; 33(3): 17–9.

114. Persani L, Calebiro D, Cordella D, et al. Genetics and phenomics of hypothyroidism due to TSH resistance. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;322:72-82. 7.

115. Cassio A, Nicoletti A, Rizzello A, et al. Current loss-of-function mutations in the thyrotropin receptor gene: when to investigate, clinical effects, and treatment. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2013;5(suppl 1):29-39

116. Villar HC, Saconato H, Valente O, et al. Thyroid hormone replacement for subclinical hypothyroidism. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;18(3):CD003419.

117. Monzani A, Prodam F, Rapa A, et al. Endocrine disorders in childhood and adolescence. Natural history of subclinical hypothyroidism in children and adolescents and potential effects of replacement therapy: a review. *Eur J Endocrinol.* 2012;168:R1-R11

118. Chen XX, Qin YF, Zhou XL, Yang RL, Shi YH, Mao HQ, Qu YP, Wang X, Zhao ZY. Diagnosis and treatment of subclinical hypothyroidism detected by neonatal screening. *World J Pediatr.* 2011 Nov;7(4):350-4

119. Cerbone M, Capalbo D, Wasniewska M, Mattace Raso G, Alfano S, Meli R, et al. Cardiovascular risk factors in children with longstanding untreated idiopathic subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:2697–703.

120. Cerbone M, Bravaccio C, Capalbo D, Polizzi M, Wasniewska M, Cioffi D, et al. Linear growth and intellectual outcome in children with long-term idiopathic subclinical hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 2011;164:591–7.

121. Leonardi D, Polizzotti N, Carta A, Gelsomino R, Sava L, Vigneri R, Calaciura F: Longitudinal study of thyroid function in children with mild hyperthyrotropinemia at neonatal screening for congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 2679–2685.

122. Tenenbaum-Rakover Y, Almashanu S, Hess O, et al. Long-term outcome of loss-of-function mutations in TSH receptor gene. *Thyroid*. 2015;25:292-299.
123. Vigone MC, Di Frenna M, Guizzardi F, et al. Mild TSH resistance: Clinical and hormonal features in childhood and adulthood. *Clin Endocrinol*. 2017;87:587–596
124. Mizuno H, Kanda K, Sugiyama Y, et al. Longitudinal evaluation of patients with a homozygous R450H mutation of the TSH receptor gene. *Horm Res*. 2009;71:318-323.
125. Nicoletti A, Bal M, De Marco G, et al. Thyrotropin-stimulating hormone receptor gene analysis in pediatric patients with nonautoimmune subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:4187-4194.
126. Eugene D, Djemli A and Van Vliet G. Sexual dimorphism of thyroid function in newborns with congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(5): 2696–2700.
127. Ng SM, Wong SC, Isherwood DM, Didi M. Biochemical severity of thyroid ectopia in congenital hypothyroidism demonstrates sexual dimorphism. *Eur J Endocrinol*. 2007 Jan;156(1):49-53.
128. Wasniewska M, Arrigo T, Crisafulli G, Aversa T, Messina MF, Salzano G, De Luca F. In the Italian population sexual dimorphism affects pre-natal thyroid migration but not biochemical severity of gland ectopia and pre-natal bone maturation. *J Endocrinol Invest*. 2008;31(4):341-5.
129. Meng Z, Lou S, Tan J, et al. Scintigraphic detection of dual ectopic thyroid tissue: experience of a Chinese tertiary hospital. *PLoS ONE* 2014; 9(4): e95686.
130. Gu T, Jiang B, Wang N, et al. New insight into ectopic thyroid glands between the neck and maxillofacial region from a 42-case study. *BMC Endocr Disord* 2015; 15: 7
131. Patil M, Ayyar V, Bantwal G, et al. Thyroid ectopia: a case series and literature review. *Thyroid Res Pract* 2015; 12: 110–115
132. Perry RJ, Maroo S, MacLennan AC, et al. Combined ultrasound and isotope scanning is more informative in the diagnosis of congenital hypothyroidism than single scanning. *Arch Dis Child* 2006; 91(12): 972–976.

133. Kocova M, Zdraveska N, Zdravkovska M, Anastasovska V, Pop Gjorceva D. Submental thyroid ectopy might cause subclinical hypothyroidism in early childhood. *SAGE Open Medical Case Reports*. 2016;4:2050313X16683623
134. Olivieri A, Stazi MA, Mastroiacovo P, Fazzini C, Medda E, Spagnolo A, De Angelis S, Grandolfo ME, Taruscio D, Cordeddu V, Sorcini M, Study Group for Congenital Hypothyroidism. A population-based study on the frequency of additional congenital malformations in infants with congenital hypothyroidism: data from the Italian Registry for Congenital Hypothyroidism (1991–1998). *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:557–562.
135. Gruters A, Jenner A, Krude H. Long-term consequences of congenital hypothyroidism in the era of screening programmes. *Best Pract Res. Clinical Endocrinol Metab*. 2002; 16: 369–382.
136. Rovet JF. In search of the optimal therapy for congenital hypothyroidism. *J. Pediatr*. 2004; 144: 698–700
137. LaFranchi SH. Approach to the diagnosis and treatment of neonatal hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Oct;96(10):2959-67.
138. Weber G, Vigone MC, Passoni A, Odoni M, Paesano PL, Dosio F, Proverbio MC, Corbetta C, Persani L, Chiumello G. Congenital hypothyroidism with gland in situ: diagnostic re-evaluation. *J Endocrinol Invest*. 2005 Jun;28(6):516-22
139. Dias VM, Campos AP, Chagas AJ, Silva RM. Congenital hypothyroidism: etiology. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2010 Aug;23(8):815-26.
140. Tamam M, Adalet I, Bakir B, Türkmen C, Darendeliler F, Baş F, Sanli Y, Kuyumcu S. Diagnostic spectrum of congenital hypothyroidism in Turkish children. *Pediatr Int*. 2009;51(4):464-8.
141. Deeb A, Elkadry I, Attia S, Al Suwaidi H, Obaid L, Schoenmakers NA. Biochemical, radiological, and genetic characterization of congenital hypothyroidism in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2016 Jul 1;29(7):801-6.

- 
142. Bubuteishvili L, Garel C, Czernichow P, Leger J. Thyroid abnormalities by ultrasonography in neonates with congenital hypothyroidism. *J Pediatr*.2003; 143:759–764.
143. De Bruyn R, Ng WK, Taylor J, Campbell F, Mitton SG, Dicks-Mireaux C, Grant DB. Neonatal hypothyroidism: comparison of radioisotope and ultrasound imaging in 54 cases. *Acta Paediatr Scand*. 1990;79:1194–1198.
144. Ueda D, Yoto Y, Sato T. Ultrasonic assessment of the lingual thyroid gland in children. *Pediatr Radiol*.1998;28:126–128.
145. Ohnishi H, Sato H, Noda H. *et al* Color Doppler ultrasonography: diagnosis of ectopic thyroid gland in patients with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*.2003;88:5145–5149
146. Chang YW, Lee DH, Hong YH, Hong HS, Choi DL, Seo DY. Congenital hypothyroidism: analysis of discordant US and scintigraphic findings. *Radiology* 2011; 258:872–879
147. Ohnishi H, Inomata H, Watanabe T, et al. Clinical utility of thyroid ultrasonography in the diagnosis of congenital hypothyroidism. *Endocr J* 2002; 49:293–297
148. Supakul N, Delaney LR, Siddiqui AR, Jennings SG, Eugster EA, Karmazyn B. Ultrasound for primary imaging of congenital hypothyroidism. *AJR Am J Roentgenol*. 2012;199(3):W360-6
149. Klingmuller V, Fiedler C, Otten A. Characteristics of thyroid sonography in infants and children. *Radiologe* 1992;32:320–326.
150. Sfakianakis GN, Ezuddin SH, Sanchez JE, Eidson M, Cleveland W. *J Nucl Med*.1999; 40(5):799-804.
151. Hanukoglu A, Perlman K, Shamis I, Brnjac L, Rovet J, Daneman D. Relationship of etiology to treatment in congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:186–191
152. Ghule S, Biassoni L, Langham S, Peters C. Thyroid isotope scans: can it predict transient or permanent hypothyroidism in babies with borderline TSH values on screening test? *Endocrine Abstracts*. 2011; **27**: P26
153. Oren A, Wang MK, Brnjac L, Mahmud FH, Palmert MR. Use of Tc-99 m thyroid scans in borderline congenital hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016 Mar;84(3):438-44.

- 
154. Lucas-Herald A, Jones J, Attaie M, Maroo S, Neumann D, Bradley T, Hermanns P, Pohlenz J, Donaldson M. Diagnostic and predictive value of ultrasound and isotope thyroid scanning, alone and in combination, in infants referred with thyroid-stimulating hormone elevation on newborn screening. *J Pediatr*. 2014;164(4):846-54
155. Fu C, Luo S, Li Y, Li Q, Hu X, Li M, Zhang Y, Su J, Hu X, Chen Y, Wang J, Xie B, Luo J, Fan X, Chen S, Shen Y. The incidence of congenital hypothyroidism (CH) in Guangxi, China and the predictors of permanent and transient CH. *Endocr Connect*. 2017 Nov;6(8):926-934.
156. Messina MF, Aversa T, Salzano G, Zirilli G, Sferlazzas C, De Luca F, Lombardo F. Early discrimination between transient and permanent congenital hypothyroidism in children with eutopic gland. *Horm Res Paediatr*. 2015; 84: 159–164
157. American Academy of Pediatrics, Rose SR; Section on Endocrinology and Committee on Genetics, American Thyroid Association, Brown RS; Public Health Committee, Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, Foley T, et al. Update of newborn screening and therapy for congenital hypothyroidism. *Pediatrics* 2006;117:2290-303.
158. Uyttendaele M, Lambert S, Tenoutasse S, Boros E, Ziereisen F, Van Vliet G, Heinrichs C, Brachet C. Congenital Hypothyroidism: Long-Term Experience with Early and High Levothyroxine Dosage. *Horm Res Paediatr*. 2016;85(3):188-97.
159. Vaidyanathan P, Pathak M, Kaplowitz PB. In congenital hypothyroidism, an initial L-thyroxine dose of 10-12 µg/kg/day is sufficient and sometimes excessive based on thyroid tests 1 month later. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2012;25(9-10):849-52
160. Mathai S, Cutfield WS, Gunn AJ, et al. A novel therapeutic paradigm to treat congenital hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;69:142–147.
161. LaFranchi SH. Should the levothyroxine starting dose be tailored to disease severity in neonates with congenital hypothyroidism? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008;4:658–659
162. Schoelwer MJ, Tu W, Zhou J, Eugster EA. Targeted levothyroxine treatment of congenital hypothyroidism. *Endocr Pract*. 2017 Sep;23(9):1067-1071.

163. Zdraveska N, Anastasovska V, Kocova M. Frequency of thyroid status monitoring in the first year of life and predictors for more frequent monitoring in infants with congenital hypothyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2016 Jul 1;29(7):795-800
164. Balhara B, Misra M, Levitsky LL. Clinical monitoring guidelines for congenital hypothyroidism: laboratory outcome data in the first year of life. *J Pediatr* 2011;58:532–7.
165. Germak JA, Foley TP, Longitudinal assessment of L-thyroxine therapy for congenital hypothyroidism. *J. Pediatr.* 1990;117:211–219
166. Delvecchio M, Faienza MF, Acquafredda A, Zecchino C, Peruzzi S, Cavallo L. Longitudinal assessment of levo-thyroxine therapy for congenital hypothyroidism: relationship with aetiology, bone maturation and biochemical features. *Horm. Res.* 2007;68:105–112
167. Donaldson M, Jones J. Optimising outcome in congenital hypothyroidism; current opinions on best practice in initial assessment and subsequent management. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* 2013;5(1):13–22
168. Delvecchio M, Salerno M, Vigone MC, Wasniewska M, Popolo PP, Lapolla R, Mussa A, Tronconi GM, D'Acunzo I, Di Mase R, Falcone RM, Corrias A, De Luca F, Weber G, Cavallo L, Faienza MF. Levothyroxine requirement in congenital hypothyroidism: a 12-year longitudinal study. *Endocrine.* 2015 Dec;50(3):674-80
169. Cho MS, Cho GS, Park SH, Jung MH, Suh BK, Koh DG. Earlier re-evaluation may be possible in pediatric patients with eutopic congenital hypothyroidism requiring lower L-thyroxine doses. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2014; 19: 141–145
170. Park IS, Yoon JS, So CH, Lee HS, Hwang JS. Predictors of transient congenital hypothyroidism in children with eutopic thyroid gland. *Ann Pediatr Endocrinol Metab.* 2017; 22(2):115-118
171. Jin HY, Heo SH, Kim YM, et al. High frequency of DUOX2 mutation in transient or permanent congenital hypothyroidism with eutopic thyroid glands. *Horm Res Paediatr.* 2014;82:252–260.

172. Muzza M, Rabbiosi S, Vigone MC, et al. The clinical and molecular characterization of patients with dysmorphogenic congenital hypothyroidism reveals specific diagnostic clues for DUOX2 defects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99:E544 –E553.
173. Narumi S, Muroya K, Asakura Y, Aachi M, Hasegawa T. Molecular basis of thyroid dysmorphogenesis: genetic screening in population-based Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96: E1838 –E1842.
174. de Filippis T, Gelmini G, Paraboschi E, Vigone MC, Di Frenna M, Marelli F et al. A frequent oligogenic involvement in congenital hypothyroidism. *Hum Mol Genet.* 2017; 26(13):2507-2514
175. Nicholas AK, Serra EG, Cangul H, Alyaarubi S, Ullah I, Schoenmakers E et al. Comprehensive Screening of Eight Known Causative Genes in Congenital Hypothyroidism With Gland-in-Situ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016; 101(12):4521-4531.
176. Fan X, Fu C, Shen Y, Li C, Luo S, Li Q et al. Next-generation sequencing analysis of twelve known causative genes in congenital hypothyroidism. *Clin Chim Acta.* 2017 May;468:76-80
177. Park KJ, Park HK, Kim YL, et al. DUOX2 mutations are frequently associated with congenital hypothyroidism in the Korean population. *Ann Lab Med.* 2016; 36:145–153
178. Zou M, Alzahrani A, Alodaib A, Al-Rijjal R, Alqahtani M, BinEssa H, Kattan W, AlQarni A, Babiker O, Meyer B, Shi Y. Molecular characterization of underlying genetic defects of congenital hypothyroidism in Saudi Arabia. *Thyroid.* 2016; 26 Suppl1: S50
179. Bakker B, Bikker H, Vulmsa T, De Randamie JSE, Wiedijk BM, de Vijlder JJM. Two decades of screening for congenital hypothyroidism in the Netherlands: TPO gene mutations in total iodide organification defects (an update). *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:3708–3712

180. Wu JY, Shu SG, Yang CF, Lee CC, Tsai FJ. Mutation analysis of thyroid peroxidase gene in Chinese patients with total iodide organification defect: identification of five novel mutations. *J Endocrinol.* 2002; 172:627–635
181. Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, Vannucchi G, Fallini C, Persani L, Beck-Peccoz P. Monoallelic expression of mutant thyroid peroxidase allele causing total iodide organification defect. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:3264–3271.
182. Bikker H, den Hartog MT, Baas F, Gons MH, Vulsma T, de Vijlder JJ. A 20-basepair duplication in the human thyroid peroxidase gene results in a total iodide organification defect and congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Jul;79(1):248-52.
183. Löf C, Patyra K, Kuulasmaa T, Vangipurapu J, Undeutsch H, Jaeschke H, Pajunen T, Kero A, Krude H, Biebermann H et al. Detection of Novel Gene Variants Associated with Congenital Hypothyroidism in a Finnish Patient Cohort. *Thyroid.* 2016 Sep;26(9):1215-24.
184. Vasudevan P, Powell C, Nicholas AK, Scudamore I, Greening J, Park SM, Schoenmakers N. Intrauterine death following intraamniotic triiodothyronine and thyroxine therapy for fetal goitrous hypothyroidism associated with polyhydramnios and caused by a thyroglobulin mutation. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep.* 2017 Jun 7;2017. pii: 17-0040
185. Narumi S, Hasegawa T. TSH resistance revisited. *Endocr J.* 2015;62(5):393-8
186. Peters C, Nicholas A, Lyons G, Langham S, Serra E, Schoenmakers E, Muzza M, Fugazzola L, Schoenmakers N. Frequent occurrence of *DUOX2* and *DUOXA2* mutations in cases with borderline bloodspot screening TSH who develop “true” congenital hypothyroidism. *Endocrine abstracts.* 2016; 45: OC5.7
187. Kizys MML, Louzada RA, Mitne-Neto M, Jara JR, Furuzawa GK, de Carvalho DP, Dias-da-Silva MR et al. *DUOX2* Mutations Are Associated With Congenital Hypothyroidism With Ectopic Thyroid Gland. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017 Nov 1;102(11):4060-4071
188. Jacques O. Is There a Link between Defects of Thyroid Hormonogenesis and Morphogenesis?. *Clin Thyroidol.* 2017; 29:10, 389-391

## 11. ПРИЛОГ

---

### Објавени трудови во меѓународни списанија со импакт фактор

1. **Zdraveska N**, Zdravkovska M, Anastasovska V, Sukarova-Angelovska E, Kocova M. Diagnostic re-evaluation of congenital hypothyroidism in Macedonia: predictors for transient or permanent hypothyroidism. *Endocr Connect.* 2018; 7(2):278-285 (импакт фактор=**2.541**)
2. **Zdraveska N**, Anastasovska V, Kocova M. Frequency of thyroid status monitoring in the first year of life and predictors for more frequent monitoring in infants with congenital hypothyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2016;29(3):297-303 (импакт фактор=**1.233**)

## RESEARCH

# Diagnostic re-evaluation of congenital hypothyroidism in Macedonia: predictors for transient or permanent hypothyroidism

Nikolina Zdraveska<sup>1</sup>, Maja Zdravkovska<sup>2</sup>, Violeta Anastasovska<sup>1</sup>, Elena Sukarova-Angelovska<sup>1</sup> and Mirjana Kocova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University Children's Hospital Skopje, Faculty of Medicine, Skopje, Republic of Macedonia

<sup>2</sup>Institute of Patophysiology and Nuclear Medicine, Faculty of Medicine, Skopje, Republic of Macedonia

Correspondence should be addressed to M Kocova: [mirjanakocova@yahoo.com](mailto:mirjanakocova@yahoo.com)

## Abstract

**Background:** Diagnostic re-evaluation is important for all patients with congenital hypothyroidism (CH) for determining the etiology and identifying transient CH cases. Our study is a first thyroxine therapy withdrawal study conducted in Macedonian CH patients for a diagnostic re-evaluation. We aimed to evaluate the etiology of CH, the prevalence of transient CH and identify predictive factors for distinguishing between permanent (PCH) and transient CH (TCH).

**Materials and methods:** Patients with CH aged >3 years underwent a trial of treatment withdrawal for 4 weeks period. Thyroid function testing (TFT), ultrasound and Technetium-99m pertechnetate thyroid scan were performed thereafter. TCH was defined when TFT remained within normal limits for at least 6-month follow-up. PCH was diagnosed when TFT was abnormal and classified according the imaging findings.

**Results:** 42 (55%) patients had PCH and 34 (45.0%) patients had TCH. Thyroid agenesis was the most prevalent form in the PCH group. Patients with TCH had lower initial thyroid-stimulating hormone (TSH) values ( $P < 0.0001$ ); higher serum thyroxine levels ( $P = 0.0023$ ) and lower mean doses of levothyroxine during treatment period ( $P < 0.0001$ ) than patients with PCH. Initial TSH level  $< 30.5$  IU/mL and levothyroxine dose at 3 years of age  $< 2.6$  mg/kg/day were a significant predictive factors for TCH; sensitivity 92% and 100%, specificity 75.6% and 76%, respectively.

**Conclusion:** TCH presents a significant portion of patients with CH. Initial TSH value and levothyroxine dose during treatment period has a predictive role in differentiating TCH from PCH. Earlier re-evaluation, between 2 and 3 years age might be considered in some patients requiring low doses of levothyroxine.

## Key Words

- ▶ congenital hypothyroidism
- ▶ etiology
- ▶ levothyroxine
- ▶ transient

Endocrine Connections  
(2018) 7, 278–285

## Introduction

Thyroid hormones play important role in the processes of neuronal migration and differentiation, myelination and synaptogenesis and are essential for proper neurodevelopment (1). Congenital hypothyroidism (CH) is generally classified into two main groups: permanent CH and transient CH depending on the lifelong therapy

requirements. The vast majority of CH children will have permanent hypothyroidism: thyroid dysgenesis (TD) due to abnormal thyroid development or thyroid dysmorphogenesis due to defects of thyroid hormone biosynthesis. The etiologic evaluation of CH is possible through several examinations, such as ultrasonography,

scintigraphy, thyroglobulin measurement and perchlorate discharge test. There are also cases where the results can be inconclusive even after performing several diagnostic tests. The etiology of CH is important for determining the severity of the disease and its prognosis, clinical management and the need for genetic counseling. A number of recent studies worldwide have reported a change in the epidemiology of CH with a doubling incidence of 1 in 1500 live newborns, mostly caused by the increasing number of the mild and potentially transient CH cases with eutopic thyroid gland (2, 3).

Long-term follow-up of CH cases is of particular interest in the last decade. Although unfavorable outcome of untreated CH is well established, recent evidence suggests that many CH children are no longer treated after the age of 3 years (4, 5, 6).

To distinguish between transient and permanent forms, the guidelines recommend re-evaluation after 3 years of age in all children with unexplained CH through a trial of treatment withdrawal. This is important since some cases of transient CH caused by identifiable or non-identifiable factors may require only a short-term therapy (7, 8).

Here, we report the results of the first thyroxine therapy withdrawal study conducted in Macedonia through a diagnostic re-evaluation following a standardized protocol. We aimed to evaluate the etiology of CH and determine the prevalence of transient hypothyroidism among CH children diagnosed in the newborn period after the neonatal screening.

Neonatal screening for CH in the Republic of Macedonia was introduced in 2002 as a pilot project and since 2007, it is mandatory in the entire country.

## Materials and methods

### Patients

Patients detected through the neonatal screening in the period April 2002–December 2015 are included. A total of 251,008 newborns were screened with a mean coverage of the 96.7%. The overall incidence of primary CH was 1/1967 and female-to-male ratio was 1.35:1 (9, 10). Children with CH detected by neonatal screening program were followed at a single center of the University Children's Hospital. The neonatal screening was carried out by determination of whole-blood thyroid-stimulating hormone (TSH) on dried blood spot specimen obtained from newborns 48 to 72h after birth by fluoroimmunoassay DELFIA assay.

The TSH cut-off level was 15IU/L in the period 2002–2010 and 10IU/L thereafter. Preterm or sick newborns were screened between the first and second week of life. Birth weight, gestational age and time of sampling were recorded on the blood spot card for adequate interpretation. Results between 10 and 15IU/L were considered borderline and repeat analysis (new blood spot card) was requested usually 7 days after the previous test. Whenever the repeated blood sampling TSH concentration was higher than 10IU/L, patients were recalled for biochemical and clinical evaluation. The diagnosis of CH was based on the abnormal thyroid function tests (TSH >10IU/L and low or normal T<sub>4</sub> or FT<sub>4</sub>) on confirmatory serum measurements.

### Study design

All children diagnosed with CH were immediately initiated on levothyroxine (LT<sub>4</sub>) treatment. The patients underwent regular thyroid function tests (TFT), as well as assessment of growth and development, mainly at 3-month intervals. Children aged ≥3 years underwent trial off therapy for period of 4 weeks and were scheduled for re-evaluation thereafter. Parents were advised to monitor for signs and symptoms of hypothyroidism. After four weeks off therapy clinical assessment, TFT and imaging studies were performed.

Children with abnormal TFT were classified as having permanent hypothyroidism (PCH), thus, LT<sub>4</sub> therapy was restarted at previous dose and titrated thereafter. Further classification of PCH was based on the ultrasound and scintigraphy findings (athyreosis, thyroid ectopia, hypoplasia or probable dysmorphogenesis). Probable dysmorphogenesis was defined when a large thyroid gland in the eutopic position with increased uptake was found on imaging studies. Children in whom TFT, ultrasound and scintigraphy were normal were followed with serial TFT tests every month for at least 6-month period. If the TFT remained normal, they were classified as transient hypothyroidism (TCH). Patients in whom the therapy was stopped between 2 and 3 years of age during the regular follow-up because of continuously normal TFT or low thyroxine dose underwent thyroid re-testing and ultrasonography. If the results were within normal limits, they were diagnosed as TCH, and no further follow-up was recommended.

### Laboratory and imaging methods

TSH and T<sub>4</sub>/FT<sub>4</sub> were measured using IMMULITE 2000 chemiluminescent enzyme immunoassay system (Siemens

Healthcare Diagnostics Inc.). Values of thyroid hormones ranging from the 3rd to the 97th percentile standardized for age were considered normal (11). Reference values: T<sub>4</sub>: 4.5–10.9 µg/dL, FT<sub>4</sub>: 0.9–1.8 ng/dL, TSH 0.4–5.0 IU/L.

Thyroid ultrasound (SonoScape SSI-5000 Color Doppler Ultrasound System, SonoScape Medical Corp., Shenzhen, China) was performed to detect the presence of the thyroid gland and assess the size and echostructure. The size of thyroid gland was determined by measurement of the volume of the thyroid lobes and their comparison with the reference values from the literature (12). Thyroid scan was performed by double-head Mediso gamma camera after an intravenous injection of 99m-technetium pertechnetate (2 MBq/kg) and obtaining standard anterior and lateral images in supine position. The presence, size and location of areas of 99mTcO<sub>4</sub> uptake were recorded.

### Data analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS for Windows statistical package (version 17.0). The following variables were analyzed: gestational age, sex, birthweight, initial values of TSH and T<sub>4</sub>, age at treatment initiation, initial LT<sub>4</sub> dose, LT<sub>4</sub> dose at 1, 2 and 3 years of age and at re-evaluation. Comparison between the two groups for numerical variables was performed with the Student's *t*-test and the Mann–Whitney test. Pearson's chi-square test was used in the comparison of proportions. One-way ANOVA analysis followed by *post hoc* Tukey HSD (honestly significant difference) test was used for comparison between the etiological subgroups of patients with permanent hypothyroidism.

Logistic regression analysis was used to investigate predictors for transient CH. Several parameters that showed significant difference between TCH and PCH groups were applied in the ROC (receiver-operating characteristic) analysis. The optimal cut-off point of each predictor was determined, and sensitivity and specificity were calculated for this cut-off value. For comparison of ROC curves, MedCalc for Windows (version 17.8, MedCalc Software, Ostend, Belgium) was used. *P* values lower than 0.05 were considered statistically significant.

### Ethical approval

All procedures performed in study were in accordance with the ethical standards of the Helsinki Medical Declaration and its later amendments. The study protocol was approved by Medical Faculty's Ethical Committee,

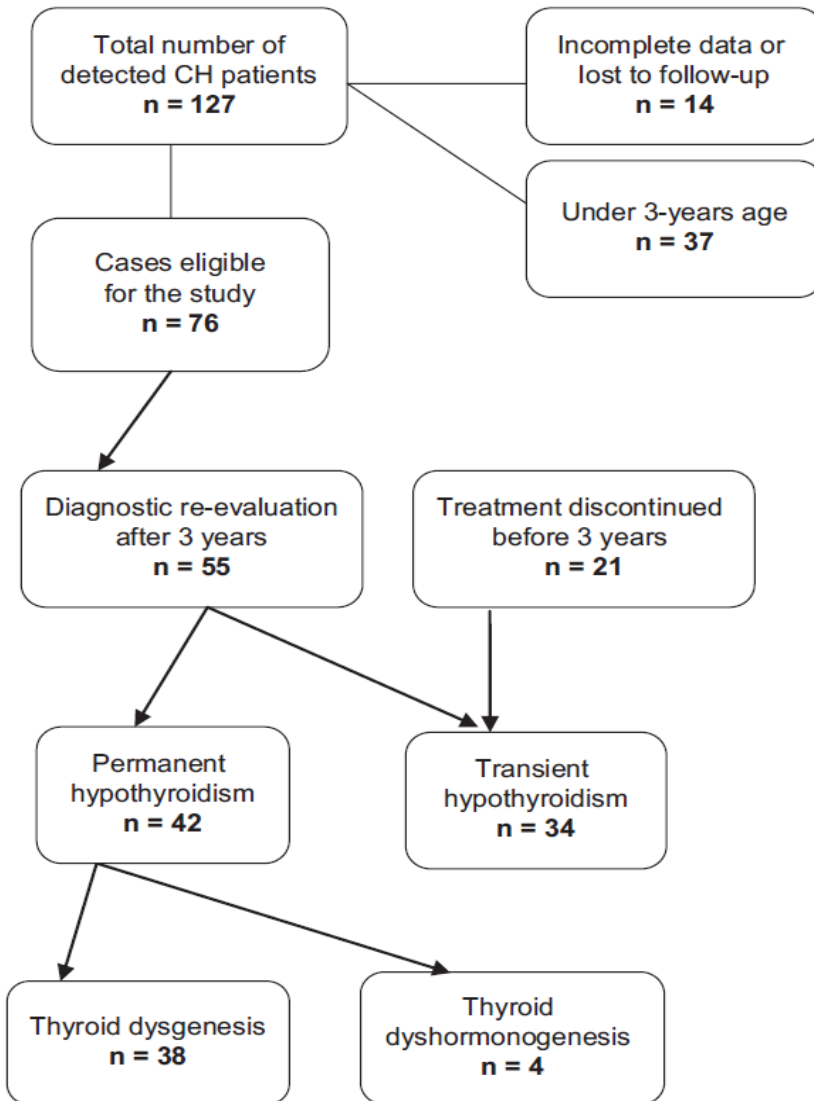
and informed consent was obtained from the parents of the children included in the study.

### Results

A total of 127 neonates detected by national neonatal thyroid screening were confirmed to have primary CH, in the period 2002–2015, with an overall incidence of 1:1967 live births. Thirty-seven children were excluded from the present study because of age less than 3 years and 14 children because of incomplete medical records, lost from follow-up, parents' refusal or Down syndrome. Therapy was interrupted in 55 CH children for mean period of 30 days (range 28–40 days). All patients were clinically euthyroid on levothyroxine therapy at the time of enrollment. The mean age was 6.5 ± 2.8 years (range: 3–13 years); 35 were girls and 20 were boys. In 21 CH children treatment was discontinued during the regular follow-up at mean age of 25.4 ± 4.7 months (range: 18–33 months). Forty-two patients (55%) were classified in the PCH group and 34 (45%) in TCH group based on the defined criteria. The prevalence of PCH was 1/3586 and the prevalence of TCH was 1/4404. Figure 1 shows the flow diagram of the study. The ratio of sex was not significantly different between TCH and PCH groups (*P* = 0.091). Treatment for CH was initiated at a mean age of 12.1 (± 4.1) days, and it was not significantly different between the groups (Table 1). Patients in the TCH group exhibited significantly lower TSH levels compared to subjects in the PCH group (Table 1). The initial levothyroxine doses, as well as LT<sub>4</sub> dose at 1, 2 and 3 years of age were significantly lower in TCH subjects (Table 1).

Thyroid agenesis was the most prevalent cause of permanent hypothyroidism present in one half of the patients (*n* = 21), followed by thyroid ectopy (*n* = 13), hypoplasia (*n* = 4) and probable thyroid dysmorphogenesis in the other 4 cases (Table 2). Among the patients with ectopic thyroid gland (10 females and 3 males), two and five patients had submental and lingual thyroid gland, respectively, and the remaining six patients had sublingual uptake on scintigraphy.

A significant difference in the TSH and T<sub>4</sub> values at diagnosis and after treatment discontinuation was also observed in children with PCH subdivided in different etiological groups: athyreosis, ectopy, hypoplasia and dysmorphogenesis, *P* < 0.05 (Table 2). Patients with thyroid agenesis had significantly higher TSH values at diagnosis compared to patients with ectopy, hypoplasia and putative dysmorphogenesis. After 4 weeks off



**Figure 1**  
Flow diagram of the follow-up study.

therapy, TSH values did not significantly differ between athyreosis and ectopies ( $P=0.427$ ). The results of the Tukey HSD *post hoc* test indicating differences within PCH subgroups are presented in Table 3.

**Predictive factors suggesting transient congenital hypothyroidism**

According to the ROC curve analysis, initial TSH value  $<30.5$  IU/mL was associated with TCH, showing 92% sensitivity and 75.6% specificity, with an area under the ROC curve (AUC) 0.850 ( $P<0.001$ ). Also initial serum  $T_4$

$>3.6$   $\mu$ g/dL was associated with TCH with 92% sensitivity and 63.4% specificity, AUC 0.778 ( $P<0.001$ ).

The optimal cut-off points for the  $LT_4$  dose during treatment as a predictor for distinguishing PCH and TCH were as follows: initial  $LT_4$  dose 11.0  $\mu$ g/kg/day, with 96% sensitivity and 70.7% specificity, AUC 0.857;  $LT_4$  dose at 1 year of age 3.0  $\mu$ g/kg/day, 86.4% sensitivity and 76.5% specificity, AUC 0.880;  $LT_4$  dose at 2 years of age 2.8  $\mu$ g/kg/day, 95.2% sensitivity and 82.6% specificity, AUC 0.904;  $LT_4$  dose at 3 years of age 2.6  $\mu$ g/kg/day, 100% sensitivity and 76% specificity, AUC 0.921. In a logistic regression analysis with an initial TSH and  $T_4$  levels,

**Table 1** Comparison of the clinical and laboratory characteristics of patients with congenital hypothyroidism.

Total (n=76)	Permanent CH (n=42)	Transient CH (n=34)	P value
Sex (N)			
Female	29	17	0.091 <sup>a</sup>
Male	13	17	
Birth weight (kg)	3.4±0.5	3.1±0.6	0.303
Gestational age (week)	39.3±1.2	38.9±1.6	0.121
Age of treatment initiation (day)	11.3±4.2	13.8±3.4	0.076
Thyroid tests at diagnosis			
TSH (μIU/L)	81.9±56.8	22.7±10.9	<0.0001
T <sub>4</sub> (μg/dL)	4.8±3.9	6.7±2.4	0.0023
Levothyroxine dose (μg/kg)			
Initial	11.8±2.1	9.2±1.5	0.002
1 year	3.7±0.8	2.4±0.7	<0.0001
2 years	3.3±0.7	1.9±0.6 (N=30)	<0.0001
3 years	3.2±0.7	1.7±0.6 (N=14)	<0.0001
At re-evaluation	2.6±0.6	1.4±0.5 (N=13)	

<sup>a</sup>The sex ratio between groups was calculated using the chi-square test.

and the levothyroxine dose during the treatment period as independent variables, the initial TSH levels and the levothyroxine dose at 3 years of age were significant predictors of a TCH diagnosis (Fig. 2 and Table 4).

### Discussion

Early detection and attainment of euthyroid status as quickly as possible are essential for all children with primary CH for achieving an optimal neurodevelopment. Another significant point in addition to early treatment is specification of underlying cause of CH, thus identifying

transient cases and preventing overtreatment. The results of our study showed that almost 45% of patients diagnosed with CH through neonatal screening had transient CH and do not require lifelong thyroid hormone supplementation. Although the prevalence of transient CH varies in different studies an increasing trend has been observed worldwide in the recent years (5, 6, 13, 14, 15, 16). One possible explanation for this increased incidence is the change in screening strategies, such as lowering the TSH cut-off values that allows more sensitive detection and early intervention. The TSH cut-off was lowered in our national thyroid screening program from 15 to 10IU/L after 2010. The overall incidence of CH significantly increased from 1/2489 up to 2010 to 1/1585 thereafter, with increasing the prevalence of transient CH cases (10). However, the optimal cut-off in this study was 30.5IU/L. Kang and coworkers reported a similar TSH cut-off point of 31 IU/L for distinguishing TCH and PCH (17). Other studies suggested initial TSH cut-off values of 28.4IU/L and 34IU/L (14, 18). Generally, it is safe to refer to the current guidelines, which suggest an immediate treatment if TSH >20IU/L and clinicians individual approach for cases with TSH values between 6IU/L and 20IU/L (7). Prematurity is often reported to be associated with TCH (19, 20). In our study, there was no significant difference in the birth weight and the duration of gestation between the TCH and PCH group. Other factors that might have contributed to TCH are ethnic modifications in the population, variations in iodine supply, endocrine-disrupting chemicals exposure etc. (3). A recently published study accessing the iodine status through TSH measurements on newborn screening reported iodine sufficiency in Macedonia (21). Considering these facts the etiology of the most of our TCH cases remains unknown.

**Table 2** Characteristics of patients with permanent congenital hypothyroidism.

Etiology	Permanent CH (n=42)			Thyroid dyshormonogenesis (n=4)	
	Athyreosis (n=21)	Ectopy (n=13)	Hypoplasia (n=4)		P
Thyroid function tests					
At time of diagnosis					
TSH (μIU/L)	122.5±51.2	67.1±40.7	31.3±17.3	30.9±18.7	<0.05*
T <sub>4</sub> (μg/dL)	2.9±2.7	6.4±4.2	7.3±4.6	6.8±3.1	<0.05*
After treatment discontinuation					
TSH (μIU/L)	72.2±10.6	58.8±27.1	35.9±21.8	27.3±10.6	<0.05*
T <sub>4</sub> (μg/dL)	1.1±0.1	3.6±2.8	6.8±3.5	3.2±3.0	<0.05*
L-Thyroxine dose					
At time of diagnosis	12.2±2.2	11.5±1.1	10.9±2.8	10.3±2.0	0.256
At time of treatment discontinuation	2.6±0.5	2.9±0.8	2.3±0.9	2.37±0.4	0.237

\*The P value corresponding to the F statistic of one-way ANOVA for the initial TSH values and TSH at re-evaluation is lower than 0.05 suggesting for significant difference between the CH etiology groups.

**Table 3** Tukey HDS ('Honestly Significant Difference') *post hoc* test results indicating which groups significantly differ from others providing 95% confidence interval.

	At diagnosis		After treatment discontinuation	
	Tukey HSD Q statistic	P value	Tukey HSD Q statistic	P value
<b>TSH value</b>				
Athyreosis vs ectopy	4.9351	0.0066**	2.1721	0.4272
Athyreosis vs hypoplasia	5.7550	0.0013**	6.8050	0.0010**
Athyreosis vs dysmorphonogenesis	5.9677	0.0010**	8.4170	0.0010**
Ectopy vs hypoplasia	2.0516	0.4923	4.7093	0.0094**
Ectopy vs dysmorphonogenesis	2.2164	0.4106	6.1942	0.0010**
Hypoplasia vs dysmorphonogenesis	0.1690	0.8999	1.2859	0.7772
<b>T<sub>4</sub> value</b>				
Athyreosis vs ectopy	3.995	0.035**	4.5641	0.0126**
Athyreosis vs hypoplasia	4.378	0.018**	8.0208	0.0010**
Athyreosis vs dysmorphonogenesis	3.047	0.153	2.9966	0.1643
Ectopy vs hypoplasia	1.058	0.866	4.1226	0.0282**
Ectopy vs dysmorphonogenesis	0.035	0.899	0.5289	0.8999
Hypoplasia vs dysmorphonogenesis	0.923	0.899	4.0283	0.0332**

\*\*P<0.05.

Patients with TCH exhibited significantly lower TSH and higher T<sub>4</sub> levels at the time of diagnosis compared to those with PCH. Some previous studies in the literature reported that the initial T<sub>4</sub> did not differentiate between TCH and PCH cases (13, 17, 22).

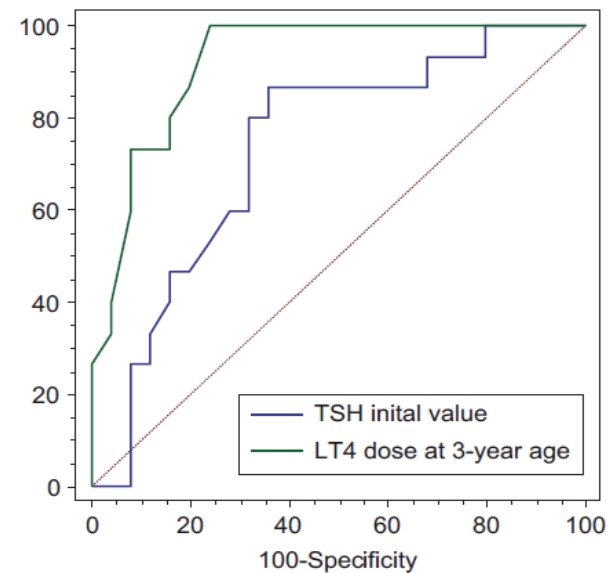
Forty-two children had permanent hypothyroidism after re-evaluation, and thyroid agenesis was the most prevalent etiology. Thyroid dysmorphonogenesis was suspected in 4 patients with PCH based on the thyroid volume ultrasound and abnormal scintigraphy uptake. However, definitive diagnosis of dysmorphonogenesis requires a perchlorate discharge test or a molecular genetic analysis and unfortunately neither of them was available in our center. The initial TSH and T<sub>4</sub> values were significantly different between the PCH subgroups, which corresponds to the reports from other studies in the literature (23, 24).

Another interesting finding in our study was the difference in the initial TSH values between patients with athyreosis and thyroid ectopy, which was not observed after trial off therapy. This might be due to the titration of the levothyroxine dose during the follow-up in patients with thyroid ectopy. Thus, the similar clinical course and therapy requirement of both athyreosis and ectopies is obvious. The levothyroxine dose was not significantly different between the PCH subgroups at initiation and at re-evaluation period.

However, the initial LT<sub>4</sub> dose was significantly different between patients with transitory and permanent hypothyroidism. The current guidelines recommend starting dose of 10–15 µg/kg/day, but considering the heterogeneity of CH, some children may require smaller

doses because of some endogenous thyroid hormone production. Since imaging studies were not performed in all of our patients at diagnosis, the initial dose was mainly based on the results of TFT. However, targeted LT<sub>4</sub> dosing based on the laboratory and thyroid anatomy might be reasonable in some prospective study in the future.

During the treatment period, significant dose differences were observed between the patients with PCH



**Figure 2** ROC curves show both the initial TSH values and the levothyroxine dose at 3 years of age were predictive factors for discrimination between transient and permanent congenital hypothyroidism.

**Table 4** Logistic regression analysis of factors associated with transitory congenital hypothyroidism.

Predictors	Coefficient	Std. error	$r_{\text{partial}}$	t	P value
	2.3069				
Initial TSH value	-0.004274	0.001965	-0.3691	-2.175	0.0376*
Initial T <sub>4</sub> value	-0.003676	0.01800	-0.03725	-0.204	0.8396
Initial LT <sub>4</sub> dose	-0.04351	0.02828	-0.2705	-1.539	0.1343
LT <sub>4</sub> dose at 1-year age	-0.08257	0.06334	-0.2315	-1.304	0.2023
LT <sub>4</sub> dose at 2-year age	-0.1185	0.06672	-0.3085	-1.776	0.0858
LT <sub>4</sub> dose at 3-year age	-0.2374	0.07304	-0.5104	-3.251	0.0028*

\*P<0.05.

and TCH (3.7 µg/kg/day vs 2.4 µg/kg/day at 12 months and 3.3 µg/kg/day vs 1.9 µg/kg/day at 24 months). Moreover, the levothyroxine dose at 3-year age was a positive predictor of TCH diagnosis. Many authors emphasize the LT<sub>4</sub> dose as a discriminate factor between TCH and PCH. Messina and coworkers reported that LT<sub>4</sub> requirements >4.9 µg/kg/day at 12 months age or >4.27 µg/kg/day at 24 months were highly suggestive of PCH, irrespective of gland ultrasonography (22).

Cho and coworkers reported that children requiring LT<sub>4</sub> dose lower than 3.25 µg/kg/day at 12 and 24 months were likely to have TCH, suggesting that earlier re-evaluation is possible in these patients (between 12 and 24 months rather than after 3 years) (18). A significant proportion of patients with TCH in our study had discontinued treatment within 36 months and confirmed to have a transient hypothyroidism thereafter. Thus, the re-evaluation through one-month trial off therapy might be considered at 2 years of age in patients requiring low doses of LT<sub>4</sub> during follow-up. In our study, a levothyroxine dose of 2.6 µg/kg at 3 years of age might be used to predict the diagnosis of TCH.

Our study presents a first diagnostic re-evaluation of Macedonian children with CH following a standardized protocol. However, it has several limitations. The small number of cases and unavailability of genetic analysis for the diagnosis of dyshormonogenesis are some of them. Extension of the study in the future with the newly diagnosed CH children, as well as the longer follow-up period of cases with transient hypothyroidism is warranted.

In conclusion, 45% of cases diagnosed with CH had of a transient form of hypothyroidism. Patients with TCH had lower initial TSH levels and higher initial T<sub>4</sub> values, as well as lower levothyroxine dose requirements during the follow-up than PCH patients. A levothyroxine dose lower than 2.6 µg/kg/day at 3 years of age might predict TCH. Although inconsistent to the current guidelines, earlier re-evaluation of children younger than 3 years might be

safe in patients requiring low doses of LT<sub>4</sub>, thus preventing unnecessary or excessive treatment of TCH.

**Declaration of interest**

All authors declare no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

**Funding**

This research did not receive any specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sector.

**References**

- Horn S & Heuer H. Thyroid hormone action during brain development: more questions than answers. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2010 **315** 19–26. (<https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.09.008>)
- Harris KB & Pass KA. Increase in congenital hypothyroidism in New York State and in the United States. *Molecular Genetics and Metabolism* 2007 **91** 268–277. (<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.03.012>)
- Persani L. Congenital hypothyroidism with gland *in situ* is more frequent than previously thought. *Frontiers in Endocrinology* 2012 **3** 18. (<https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00018>)
- Gruters A, Jenner A & Krude H. Long-term consequences of congenital hypothyroidism in the era of screening programmes. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002 **16** 369–382. (<https://doi.org/10.1053/beem.2002.0202>)
- Kemper AR, Ouyang LJ & Grosse SD. Discontinuation of thyroid hormone treatment among children in the United States with congenital hypothyroidism: findings from health insurance claims data. *BMC Pediatrics* 2010 **10** 9. (<https://doi.org/10.1186/1471-2431-10-9>)
- Eugster EA, LeMay D, Zerlin JM & Pescovitz OH. Definitive diagnosis in children with congenital hypothyroidism. *Journal of Pediatrics* 2004 **144** 643–647. (<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2004.02.020>)
- Leger J, Olivier A, Donaldson M, Torresani T, Krude H, van Vliet G, Polak M, Butler G, ESPE-PES-SLEP-JSPE-APEG-APPES-ISPAAE, Congenital Hypothyroidism Consensus Conference Group et al. European Society for Paediatric Endocrinology consensus guidelines on screening, diagnosis, and management of congenital hypothyroidism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2014 **99** 363–384. (<https://doi.org/10.1210/jc.2013-1891>)
- American Academy of Pediatrics, Rose SR, Section on Endocrinology and Committee on Genetics, American Thyroid Association, Brown RS, Public Health Committee, Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, Foley T, Kaplowitz PB, Kaye CI, et al. Update of newborn screening and therapy for congenital hypothyroidism.



- Pediatrics* 2006 **117** 2290–2303. (<https://doi.org/10.1542/peds.2006-0915>)
- 9 Kocova M, Anastasovska V, Sukarova-Angelovska E, Tanaskoska M & Taseva E. Clinical practice: experience with newborn screening for congenital hypothyroidism in the Republic of Macedonia – a multiethnic country. *European Journal of Pediatrics* 2015 **174** 443–448. (<https://doi.org/10.1007/s00431-014-2413-4>)
  - 10 Anastasovska A & Kocova M. Impact of lower screening TSH cutoff level on the increasing prevalence of congenital hypothyroidism. *International Journal of Neonatal Screening* 2017 **3** 007. (<https://doi.org/10.3390/ijns3020007>)
  - 11 Kapelari K, Kirchlechner C, Hogler W, Schweitzer K, Virgolini I & Moncayo R. Pediatric reference intervals for thyroid hormone levels from birth to adulthood: a retrospective study. *BMC Endocrine Disorders* 2008 **8** 15. (<https://doi.org/10.1186/1472-6823-8-15>)
  - 12 Chanoine JP, Toppe V, Lagasse R, Spehl M & Delange F. Determination of thyroid volume by ultrasound from the neonatal period to late adolescence. *European Journal of Pediatrics* 1991 **150** 395–399. (<https://doi.org/10.1007/BF02093716>)
  - 13 Rabbiosi S, Vigone MC, Cortinovis F, Zamproni I, Fugazzola L, Persani L, Corbetta C, Chiumello G & Weber G. Congenital hypothyroidism with eutopic thyroid gland: analysis of clinical and biochemical features at diagnosis and after re-evaluation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2013 **98** 1395–1402. (<https://doi.org/10.1210/jc.2012-3174>)
  - 14 Lim HK, Kim KH, Kim SH, No HY, Kim CJ, Woo YJ & Hwang TJ. Predictors of transient hypothyroidism in neonatal screening test. *Journal of Korean Society of Pediatric Endocrinology* 2006 **11** 50–56.
  - 15 Unuvar T, Demir K, Abaci A, Buyukgebiz A & Bober E. The role of initial clinical and laboratory findings in infants with hyperthyrotropinemia to predict transient or permanent hypothyroidism. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology* 2013 **5** 170–173. (<https://doi.org/10.4274/jcrpe.931>)
  - 16 Korzeniewski SJ, Grigorescu V, Kleyn M, Young WI, Birbeck G, Todem D, Romero R & Paneth N. Transient hypothyroidism at 3-year follow-up among cases of congenital hypothyroidism detected by newborn screening. *Journal of Pediatrics* 2013 **162** 177–182. (<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.06.050>)
  - 17 Kang MJ, Chung HR, Oh YJ, Shim YS & Hwang IT. Three-year follow-up of children with abnormal newborn screening results for congenital hypothyroidism. *Pediatrics and Neonatology* 2017 **58** 442–448. (<https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2017.01.002>)
  - 18 Cho MS, Cho GS, Park SH, Jung MH, Suh BK & Koh DG. Earlier reevaluation may be possible in pediatric patients with eutopic congenital hypothyroidism requiring lower L-thyroxine doses. *Annals of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2014 **19** 141–145. (<https://doi.org/10.6065/apem.2014.19.3.141>)
  - 19 Corbetta C, Weber G, Cortinovis F, Calebiro D, Passoni A, Vigone MC, Beck-Peccoz P, Chiumello G & Persani L. A 7-year experience with low blood TSH cutoff levels for neonatal screening reveals an unsuspected frequency of congenital hypothyroidism (CH). *Clinical Endocrinology* 2009 **71** 739–745. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03568.x>)
  - 20 Radetti G, Fanolla A, Pappalardo L & Gottardi E. Prematurity may be a risk factor for thyroid dysfunction in childhood. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007 **92** 155–159. (<https://doi.org/10.1210/jc.2006-1219>)
  - 21 Anastasovska V & Kocova M. Newborn screening for thyroid-stimulating hormone as an indicator for assessment of iodine status in the Republic of Macedonia. *Journal of Medical Biochemistry* 2016 **35** 385–389. (<https://doi.org/10.1515/jomb-2016-0023>)
  - 22 Messina MF, Aversa T, Salzano G, Zirilli G, Sferlazzas C, De Luca F & Lombardo F. Early discrimination between transient and permanent congenital hypothyroidism in children with eutopic gland. *Hormone Research in Paediatrics* 2015 **84** 159–164. (<https://doi.org/10.1159/000435811>)
  - 23 Dias VM, Campos AP, Chagas AJ & Silva RM. Congenital hypothyroidism: etiology. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2010 **23** 815–826. (<https://doi.org/10.1515/jpem.2010.131>)
  - 24 Perry RJ, Maroo S, MacLennan AC, Jones JH & Donaldson MDC. Combined ultrasound and isotope scanning is more informative in the diagnosis of congenital hypothyroidism than single scanning. *Archives of Disease in Childhood* 2006 **91** 972–976. (<https://doi.org/10.1136/adc.2006.096776>)

Received in final form 10 January 2018

Accepted 15 January 2018

Accepted Preprint published online 15 January 2018

Nikolina Zdraveska, Violeta Anastasovska and Mirjana Kocova\*

# Frequency of thyroid status monitoring in the first year of life and predictors for more frequent monitoring in infants with congenital hypothyroidism

DOI 10.1515/jpem-2015-0446

Received November 20, 2015; accepted March 7, 2016; previously published online April 18, 2016

## Abstract

**Background:** The essential role of thyroid hormones for normal brain development during a critical period of life is well established. Neonatal screening programs for congenital hypothyroidism (CH) enable early detection of patients and attainment of euthyroid status as quickly as possible. Adequate and accurate monitoring of thyroid function is necessary. In the study we aimed to determine the periodicity of thyroid function testing in the first year of life (3-month intervals versus <3-month intervals monitoring). **Methods:** We retrospectively analyzed charts of CH children from Macedonia detected on neonatal screening during a 3-year period (2011–2014). Needs for monthly thyroid monitoring were defined according to the recommendations: a dose change within a month of a previous control, values of  $T_4/FT_4$  not in the upper half of the reference range, and a high or very low thyroid-stimulating hormone (TSH) value.

**Results:** Monthly thyroid testing was indicated in more than a third of CH patients during the first year of life. Children who needed more frequent monitoring intervals had a higher initial value of TSH ( $p=0.032$ ) and a lower value of  $T_4$  ( $p=0.038$ ) than those requiring less frequent monitoring. The sex, birth weight, age of treatment onset, initial L-thyroxine dose, and L-thyroxine dose at 1-year of age in our study were not predictive factors for more frequent thyroid monitoring.

**Conclusions:** Children with severe hypothyroidism at birth are potential candidates for more frequent thyroid monitoring during the first year of life, although the individual patient approach should not be avoided as variations in TSH values are very common.

**Keywords:** congenital hypothyroidism; infants; monitoring; newborn screening; thyroid.

## Introduction

Congenital hypothyroidism (CH), defined as deficiency of thyroid hormones at birth is one of the most important endocrine diseases in childhood with a complex etiology.

The incidence of CH diagnosed by neonatal screening varies per population, ranging from 1 in 2000 to 1 in 3000 births and is comparatively higher than the reported incidence prior to the era of screening [1]. Additionally, many studies worldwide report a continuous increase in the incidence within the last 20 years of screening [2–4]; the reason is not completely understood. A change in screening strategies, such as lowering the thyroid-stimulating hormone (TSH) cut-off values, but also the increased number of premature and low-birth-weight newborns, multiple pregnancies, variations in iodine supply and exposure to endocrine disrupting chemicals might have a contribution [5]. Neonatal screening for CH in the Republic of Macedonia was introduced in 2002 as a pilot project and since 2007 it is mandatory in the entire country. The incidence of CH in Macedonia is 1 in 2159 newborns [6] and is thus comparable to other European countries [7].

The essential role of thyroid hormones in brain development during the first 24–36 months of age is well established; thus prompt normalization of thyroid hormone levels is essential [8].

Monitoring of thyroid function requires frequent determination of thyroxine ( $T_4/FT_4$ ) and TSH values to ensure the optimal L-thyroxine ( $L-T_4$ ) dosage and compliance for a favorable neurocognitive outcome. The main

\*Corresponding author: Prof. Mirjana Kocova, MD, PhD, Department for Endocrinology and Genetics, University Children's Hospital, 1000 Skopje, Republic of Macedonia, Phone: +389 2 3111713, Fax: +389 2 3176167, E-mail: mirjanakocova@yahoo.com

Nikolina Zdraveska: University Children's Hospital, Skopje, Republic of Macedonia

Violeta Anastasovska: Laboratory for neonatal thyroid screening, University Children's Hospital, Skopje, Republic of Macedonia

goal is to maintain TSH in the age specific reference range and  $T_4$  or  $FT_4$  in the upper half of the reference range. Guidelines for thyroid function monitoring in CH patients are not uniform internationally.

In the latest guideline the American Academy of Pediatrics recommends monitoring of the thyroid function as follows: (1) 2–4 weeks after onset of treatment; (2) every 1–2 months during the first 6 months of life; (3) every 3–4 months from the age of 6 months until 3 years; and (4) every 6–12 months until completion of growth [9]. These are similar to the UK Newborn Screening Center recommendations from 2013 [10]. The new Consensus Guideline from the European Society for Pediatric Endocrinology (ESPE) recommends monitoring every 2 weeks until normalization of TSH values, then every 1–3 months during the first year of life, enabling the clinician to determine individual patient follow-up intervals depending on the results and response to the therapy. Additional tests should be carried out 4–6 weeks after any change of the L- $T_4$  dose [11].

Results from the recent clinical studies suggest that certain factors influence the long-term outcome in patients with CH, such as the hypothyroidism severity, the age of therapy initiation, dose of L- $T_4$ , and time needed to achieve euthyroidism [12, 13], but also social factors such as, parental schooling, living in rural areas and few clinic visits in the first year [14].

Unfortunately, there are no criteria that can predict the evolution of CH especially in children with mild hypothyroidism. It is clear that the treatment and follow-up strategy based on the initial TSH values is too simplified.

The aim of our study was to determine whether our patients with CH needed more frequent monitoring during the first year of life (intervals <3 months) and which factors influenced the needed frequency of monitoring.

## Materials and methods

The study included retrospective analysis of 37 children with congenital hypothyroidism detected by neonatal screening in the period from 2011 to 2014. All patients with CH were followed-up by pediatric endocrinologists at the University Children's Hospital in Skopje, Macedonia.

All procedures performed in study were in accordance with the ethical standards of the 1964 Helsinki declaration and its later amendments. For this retrospective type of study formal consent is not required.

The neonatal screening was done by determination of whole-blood TSH on dried blood spot specimen by fluoroimmunoassay (DELFA neonatal TSH, LKB) obtained from newborns 48–72 h after birth. The TSH cut-off level was 10 mIU/L. Preterm or sick newborns were screened between the first and second week of life. Birth weight, gestational age, and time of sampling were obviously

recorded on the blood spot card for adequate interpretation. Results between 10 and 20 mIU/L were considered borderline and repeat analysis (new blood spot card) was requested usually 7 days after the previous test.

The diagnosis of CH was made when TSH level was higher than 10 mIU/L with low or normal  $T_4$  or  $FT_4$  values on confirmatory serum measurements (IMMULITE 2000 chemiluminescent enzyme immunoassay system, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., NY, USA). In all diagnosed children treatment with L- $T_4$  was immediately initiated.

Thyroid ultrasound (SonoScape SSI-5000 Color Doppler Ultrasound System, SonoScape Medical Corp., Shenzhen, China) was performed at diagnosis and during follow-up, in order to detect the presence of the thyroid gland in its normal position and to assess the size and echostructure in patients with “in situ” thyroid. The size of thyroid gland was determined by measurement of the volume of the thyroid lobes and their comparison with the reference values from the literature [15, 16]. Thyroid scan was not performed at birth.

All patients underwent several thyroid function tests during the first year, as per the ESPE recommendations. The frequency of follow-up visits varied among the patients; the intervals being between 1 and 3 months depending on the individual thyroid function results or the need for treatment change.

The main goal of therapy was to maintain the TSH value within the age specific reference range (but not <0.05 mIU/L) and  $T_4$ / $FT_4$  in the upper half of the reference values [11]. If these conditions were not met follow-up within a month was scheduled.

Values of thyroid hormones ranging from the 3rd to the 97th percentile standardized for age were considered normal [17]. Reference values after 3 months of age were the following:  $T_4$ : 4.5–10.9  $\mu\text{g/dL}$ ,  $FT_4$ : 0.9–1.8 ng/dL, TSH 0.4–5.0 mIU/L.

The need for more frequent monitoring during the first year was determined based on the following criteria: (1) 4–6 weeks after any dose change, (2)  $T_4$ / $FT_4$  values outside the upper half of the reference range, (3) elevated TSH above 10 mIU/L regardless of the value of  $T_4$ / $FT_4$ ; and (4) TSH value lower than 0.1 mIU/L. Thus, the patients were subsequently divided in two groups: Group 1 – patients that were followed up monthly (range 4–6 weeks) and Group 2 – patients that were followed up in 3-month intervals during the first year of life.

The following data were retrospectively analyzed from the medical records: demographic and clinical characteristics: perinatal history, associated malformations (syndromes, congenital heart defects, other system anomalies), family history of thyroid disease (congenital hypothyroidism, autoimmune thyroid disease); laboratory results at diagnosis, ultrasound finding, age of therapy initiation, initial dose of L- $T_4$ , dose of L- $T_4$  at 1 year of age and the infant neurodevelopment. We also analyzed changes in dose therapy during the first year of life and the values of TSH and  $T_4$ / $FT_4$  at each outpatient control. Assessment of infant neurodevelopment included: head circumference measurement; neurosensory evaluation; motor and tone assessment and age of achieving milestones: motor (head support, sitting, crawling, pincer grasp and standing) and mental (smile, recognizing familiar faces, object transfer between hands and language development). IQ determination was not possible at this stage of the study and it is planned during patients follow-up at later age.

## Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the SPSS program, version 17.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The following

variables were analyzed as potential predictive factors for the need of monitoring during the first year of life: gestational age, sex, birth-weight, initial values of TSH and  $T_4$ , thyroid dysgenesis, age of starting treatment and initial L-thyroxine dose. Comparison between the two groups for each of these variables was made with the Student's t-test and the Mann-Whitney test. For determination of the independent predictive factors for monthly thyroid monitoring logistic regression analysis was used, through calculating the odds ratio (OR) value. Statistical precision of OR was calculated with the limits of confidence – confidence intervals (CI). P-values lower than 0.05 were considered statistically significant.

## Results

During 3 years of neonatal screening 37 children with CH were detected. Four patients were lost from follow-up or excluded due to non-compliance. Table 1 summarizes the demographic, clinical and therapeutic features of our patients. Treatment was introduced in the second week of life, 12.1±2.7 postnatal day with the exception of three patients who received first treatment after 2 weeks of age, due to prematurity and late taken thyroid screening (n=1) or due to borderline TSH elevation and the necessity of repeated analysis before the initiation of therapy (n=2). Two children with CH had congenital heart malformations: atrial (n=1) and ventricular septal defect (n=1), and two patients had older siblings with congenital hypothyroidism identified on neonatal screening. Twelve patients

(36.4%) needed more frequent follow-up (intervals shorter than 3 months) during the first year of life. Children who needed more frequent monitoring intervals had higher initial value of TSH (72.2±54.1 mIU/L vs. 38.1±32.0 mIU/L; p=0.032) and lower initial values of  $T_4$  (4.16±2.6 µg/dL vs. 9.6±4.6 µg/dL; p=0.038) than those requiring monitoring at 3-month intervals (Table 2). In five patients from the first group the monthly monitoring was indicated only because of TSH suppression (TSH<0.05 mIU/L). The sex, birth weight, age of treatment initiation, initial L-thyroxine, and L-thyroxine dose at 1 year of age in our study were not significantly different between the groups followed-up monthly and at 3-month intervals (Table 2). Table 3 reports the odds of predictive factors for monthly thyroid monitoring in the first year of life. The baseline value of TSH >40 mIU/L and  $T_4$  <4.4 µg/dL were significant predictive factors for monthly thyroid monitoring in the first year of life; OR 2.8 (CI 0.64–12.09) and OR 2.5 (CI 0.57–10.93), respectively.

Neurodevelopmental assessment showed the following results: normal head examination, visual fixation and pursuit and hearing in all children and normal tone in 97% of the patients. There was no significant difference in age of milestones appearance, both motor and mental between the two analyzed groups.

## Discussion

Our patients were managed mostly according to the ESPE recommendations and thyroid monitoring was planned at 1–3-month intervals based on the individual thyroid tests. However, 36.4% of the patients in our study required monitoring of the thyroid function at shorter intervals than 3 months during the first year.

In our study, an important predictive factor for monitoring intervals was the severity of hypothyroidism at birth: children who required more frequent controls during the first year generally had higher baseline TSH and lower  $T_4$  values. The adequate treatment compliance might explain the patients who did not require monthly follow-up despite initially high TSH and low  $T_4$  levels. Although all of the patient's parents/family members declared adherence to the prescribed dose of  $LT_4$ , there might be uncertainties in the manner and way of administration that could hinder treatment compliance and effectiveness. Balhara et al. in a study that included 70 CH patients found that more than a third of the patients required monthly monitoring of thyroid function between 6 and 12 months of age [18]. They also reported that initial

**Table 1:** Clinical, laboratory and treatment characteristics at diagnosis in children with CH (n=33).

Sex, n (%)	
Male	13 (40%)
Female	20 (60%)
Gestational age, n (%)	
Term (>37)	30 (90.9%)
Preterm (<37)	3 (9.1%)
Birth weight (mean±SD), g	3157±475
Associated anomalies (n, %)	2 (6%)
Positive family history for thyroid diseases (n, %)	2 (6%)
Thyroid ultrasound (n, %)	
Dysgenesis	12 (36.4%)
"In situ" thyroid gland	21 (63.6%)
TSH value (mean/range)	
Blood spot TSH, mIU/L	55.7 (10.1–190)
Serum TSH, mIU/L	63.1 (11.4–300)
Age at start of L-thyroxine treatment – days (mean/range)	12.1 (7.0–16.0)
Initial dose of L- $T_4$ (mean±SD), µg/kg/day	10.4±2.6
Euthyroidism achieved after 4 week treatment (n, %)	30 (91%)
Dose of $LT_4$ at 1 year age (mean±SD), µg/kg/day	2.90±1.06

**Table 2:** Factors predicting monitoring intervals in children with CH during the first year of life.

Predictive factors	Group 1	Group 2	p-Value
	Monthly monitoring (n=12)	3-Month monitoring (n=21)	
Baseline TSH, mIU/L	72.2±54.1	38.1±32.0	0.032 <sup>a</sup>
Baseline T <sub>4</sub> , µg/dL	4.16±2.6	9.6±4.6	0.038 <sup>a</sup>
Gender (% female)	58%	62%	0.846
Birth weight, g	3274.1±227.0	3060.5±534.4	0.201
Age of Initiation of therapy L-T <sub>4</sub> , days	12.75±3.17	12.10±2.53	0.527
Initial dose of L-T <sub>4</sub> , µg/kg	10.7±2.2	9.8±2.7	0.387
Euthyreotic state after 4 weeks treatment, %	83.3%	95.2%	0.266
Dysgenesis, %	41.6%	33.3%	0.644
LT <sub>4</sub> dose at 1 year age, µg/kg	3.25±0.78	2.68±1.17	0.182

<sup>a</sup>p<0.05.**Table 3:** Predictors for monthly monitoring in the first year of life – odds ratios and 95% confidence intervals (CI).

Predictor	Odds ratio	Lower confidence limit	Upper confidence limit
TSH>40 mIU/L	2.8000	0.6483	12.0927
T <sub>4</sub> <4.4 µg/dL	2.5000	0.5717	10.9323
Sex (Female)	0.8615	0.2028	3.6606
Dysgenesis	0.7000	0.1621	3.0232
Initial LT <sub>4</sub> dose >10.2 µg/kg	0.9091	0.2199	3.7577
Euthyroidism after 4 weeks	0.2500	0.0202	3.0999

TSH and T<sub>4</sub> values were significant prognostic factors for monthly thyroid controls after 6 months of age.

In our study the frequency of CH patients with thyroid dysgenesis (thyroid agenesis, ectopia or hypoplasia) and patients with normal “gland in situ” (36.4% vs. 63.6%), was different compared to the recent report 61.4% dysgenesis vs. 38.6% “gland in situ” which includes all children with CH diagnosed since the start of the neonatal screening program in Macedonia (12-year period) [6]. These modification in CH epidemiology was also observed in other studies [19, 20]. Corbetta et al. in a study analyzing a 7-year experience with lower TSH cut-off values on neonatal screening reported increased incidence of CH with “gland in situ” in 68% of patients vs. 32% of CH due to dysgenesis [19]. However, more studies are needed to clearly define this large group of “gland in situ” CH children that usually evolve toward a mild thyroid dysfunction later in life for their appropriate treatment and follow-up strategy [5]. The presence of thyroid dysgenesis did not influence the frequency of the follow-up intervals in the first year of life in our study.

Most of the children with CH detected on screening achieve normal growth and neurointellectual development. However, there are continued reports of persisting mild neurocognitive impairment in CH children, including reduced intelligence quotient (IQ), problems with behavior and attention, as well as subtle fine motor, language,

and visuospatial impairment [21, 22]. Most of our patients had normal neurodevelopment at the age of 1 year. Slight motor delay was present in two patients, one of which was prematurely born. There was no significant difference between the groups in either motor or mental development during the first year of life. However, further long-term follow-up is required for the neuro-intellectual outcome, and its correlation with the hypothyroidism severity and follow-up intervals. Albert et al. reported no evidence of intellectual or motor impairment in children with CH identified on newborn screening treated with high initial doses and frequent biochemical monitoring; the time to normalize thyroid function was the only apparent factor contributing to the neurodevelopmental outcome [23].

The average age of introduction of L-T<sub>4</sub> treatment in our study was 12.1 postnatal days, thus it is comparable with the 11.7 average days reported in the recently published study [6]. The age of therapy initiation was not a predictive factor for subsequent intervals of thyroid monitoring.

The initial dose of L-T<sub>4</sub> in our study was 10.4±2.6 µg/kg and it was not significantly different between the groups that were followed-up monthly vs. 3-month intervals.

Jones et al. in a study showed that high initial dose regimen normalized thyroid function earlier compared to the lower therapeutic dose regimen without any adverse effects on growth during the first 3 years [24]. The initial

L-T<sub>4</sub> dose in our patients was mainly based on the hypothyroidism severity at birth and normalization of the serum thyroid tests appeared in 91% of the patients mainly after 2 weeks of treatment initiation. There was no difference in the time of achieving euthyroid state between the two analyzed groups.

The dose of L-T<sub>4</sub> at the age of 1 year in our study was not significantly different between the groups. L-T<sub>4</sub> daily requirements at 1-year of age might have a predictive value for the evolution of the CH and should be investigated in our patients in the future, after the therapy withdrawal at minimum 3 years of age. Messina et al. in a recently published study found that L-T<sub>4</sub> dose of >4.9 µg/kg/day at 12 months was highly suggestive of permanent CH, while L-T<sub>4</sub> dose <1.7 µg/kg/day at 12 months suggestive for transient CH; irrespective of gland ultrasonography [25].

Our study provides preliminary data about the thyroid monitoring requirements in children with CH during the first year of life. Adequate and accurate monitoring of thyroid function is necessary in order to achieve optimal development. It is important to implement in practice the evidence based recommendations issued by relevant international associations. However, individualization of the protocols should not be avoided since variations in TSH values are common. Further studies that will include a larger number of patients are required to define optimal follow-up intervals for monitoring patients with CH.

**Author contributions:** All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.

**Research funding:** None declared.

**Employment or leadership:** None declared.

**Honorarium:** None declared.

**Competing interests:** The funding organization(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

## References

- Grosse SD, Van Vliet G. Prevention of intellectual disability through screening for congenital hypothyroidism: how much and at what level? *Arch Dis Child* 2011;96:374–9.
- Deladoëy J, Ruel J, Giguere, Vliet GV. Is the incidence of congenital hypothyroidism really increasing? A 20-year retrospective population based study in Québec. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:2422–9.
- Harris KB, Pass KA. Increase in congenital hypothyroidism in New York State and in the United States. *Mol Genet Metab* 2007;91:268–77.
- Pearce MS, Korada M, Day J, Turner S, Allison D, et al. Increasing incidence, but lack of seasonality, of elevated TSH levels, on newborn screening, in the North of England. *J Thyroid Res* 2010;2010:101948.
- Persani L. Congenital hypothyroidism with gland in situ is more frequent than previously thought. *Front Endocrinol* 2012;3:18.
- Kocova M, Anastasovska V, Sukarova-Angelovska E, Tanaskoska M, Taseva E. Clinical practice: experience with newborn screening for congenital hypothyroidism in the Republic of Macedonia – a multiethnic country. *Eur J Pediatr* 2015;174:443–8.
- Loeber JG, Burgard P, Cornel MC, Rigter T, Weinreich SS, et al. Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 1 – From blood spot to screening result. *J Inher Metab Dis* 2012;35:603–11.
- Heyerdahl S. Long-term outcome in children with congenital hypothyroidism. *Acta Paediatr* 2001;90:1220–2.
- American Academy of Pediatrics, Rose SR, Section on Endocrinology and Committee on Genetics, American Thyroid Association, Brown RS, Public Health Committee, Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, Foley T, Kaplowitz PB, Kaye CI, Sundararajan S, Varma SK. Update of newborn screening and therapy for congenital hypothyroidism. *Pediatrics* 2006;117:2290–303.
- Newborn blood spot screening in the UK: revised standards and guidelines. Available at: <http://newbornbloodspot.screening.nhs.uk/standards>. Accessed on 1 January 2013.
- Léger J, Olivier A, Donaldson M, Torresani T, Krude H, et al. European Society for Paediatric Endocrinology consensus guidelines on screening, diagnosis, and management of congenital hypothyroidism Congenital Hypothyroidism Consensus Conference Group. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:363–84.
- Dubuis JM, Glorieux J, Richer F, Deal CL, Dussault JH, et al. Outcome of severe congenital hypothyroidism: closing the developmental gap with early high dose levothyroxine treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:222–7.
- Heyerdahl S, Kase BF, Lie SO. Intellectual development in children with congenital hypothyroidism in relation to recommended thyroxine treatment. *J Pediatr* 1991;118:850–7.
- Krelsner E, Schermann L, Camargo-Neto E, Gross JL. Predictors of intellectual outcome in a cohort of Brazilian children with congenital hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60:250–5.
- Chanoine JP, Toppe V, Lagasse R, Spehl M, Delange F. Determination of thyroid volume by ultrasound from the neonatal period to late adolescence. *Eur J Pediatr* 1991;150:395–9.
- Perry RJ, Hollman AS, Wood AM, Donaldson MD. Ultrasound of the thyroid gland in the newborn: normative data. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2002;87:209–11.
- Kapeliari K, Kirchlechner C, Högl W, Schweltzer K, Virgolini I, Moncayo R. Pediatric reference intervals for thyroid hormone levels from birth to adulthood: a retrospective study. *BMC Endocrine Disorders* 2008;8:15.
- Balhara B, Misra M, Levitsky LL. Clinical monitoring guidelines for congenital hypothyroidism: laboratory outcome data in the first year of life. *J Pediatr* 2011;58:532–7.
- Corbetta C, Weber G, Cortinovis F, Calebloro D, Passoni A, et al. A 7-year experience with low blood TSH cutoff levels for neonatal screening reveals an unsuspected frequency of congenital hypothyroidism (CH). *Clin Endocrinol* 2009;71:739–45.

20. Mengreli C, Kanaka-Gantenbein C, Girginoudis P, Magiakou MA, Christakopoulou I, et al. Screening for congenital hypothyroidism: the significance of threshold limit in false-negative results. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4283–90.
21. Dimitropoulos A, Mollnar L, Etter K, Torresani T, Lang-Muritano M, et al. Children with congenital hypothyroidism: long-term intellectual outcome after early high-dose treatment. *Pediatr Res* 2009;65:242–8.
22. van der Sluis Veer L, Kempers MJ, Wiedijk BM, Last BF, Grootenhuis MA, et al. Evaluation of cognitive and motor development in toddlers with congenital hypothyroidism diagnosed by neonatal screening. *J Dev Behav Pediatr* 2012;33:633–40.
23. Albert BB, Heather N, Derralk JG, Cutfield WS, Wouldes T, et al. Neurodevelopmental and body composition outcomes in children with congenital hypothyroidism treated with high-dose initial replacement and close monitoring. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:3663–70.
24. Jones JH, Gellén B, Paterson WF, Beaton S, Donaldson MD. Effect of high versus low initial doses of L-thyroxine for congenital hypothyroidism on thyroid function and somatic growth. *Arch Dis Child* 2008;93:940–4.
25. Messina MF, Aversa T, Salzano G, Zirilli G, Sferlazzas C, et al. Early discrimination between transient and permanent congenital hypothyroidism in children with eutopic gland. *Horm Res Paediatr* 2015;84:159–64.