

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI**

**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

**MUDr. Renata Pomahačová**

**Plzeň, 2010**

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI**

**JUVENILNÍ LYMFOCYTÁRNÍ THYREODITIS  
A SOUČASNÝ VÝSKYT INFEKCE HELICOBACTER  
PYLORI**

**AUTOIMMUNE THYROIDITIS IN CHILDREN AND THE  
ROLE OF SIMULTANEOUS HELICOBACTER PYLORI  
INFECTION**

**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

**MUDr. Renata Pomahačová**

**Plzeň**

**2010**

## Obsah

1. Úvod .....	5
2. Současný stav problematiky .....	7
2.1 Juvenilní lymfocytární thyreoiditis .....	7
2.2 Infekce <i>Helicobacter pylori</i> .....	14
2.3 Vztah mezi juvenilní lymfocytární thyreoiditidou a infekcí <i>Helicobacter pylori</i> .....	26
2.4 Cytokiny, chemokiny.....	27
3. Cíl studie .....	31
4. Metodika.....	33
5. Výsledky.....	
5.1 Soubor, metodika, výsledky, závěr a diskuse (Cíl 3.1).....	41
5.2. Soubor, metodika, výsledky, závěr a diskuse (Cíl 3.2).....	51
5.3 Soubor, metodika, výsledky, závěr a diskuse (Cíl 3.3 ).....	64
6. Závěry.....	87
7. Souhrn.....	92
8. Summary .....	98
9. Literatura autora se vztahem k řešené problematice .....	105
10.Literatura použitá se vztahem k řešené problematice .....	108

### *Seznam použitých zkratek*

JLT	Juvenilní lymfocytární thyreoiditis
AT	Autoimunitní thyreoiditis
GB choroba	Graves-Basedowova choroba
APS	Autoimunitní polyglandulární syndrom
H. pylori	<i>Helicobacter pylori</i>
LPS	Lipopolysacharid
IL	Interleukin
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor-beta
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GRO	Growth Regulated Oncogene
GROalpha	Growth Regulated Oncogene alpha
MCP	Monocyte Chemoattractant Proteins
MIG	Monokine-induced by Interferon gamma
RANTES	Regulated upon Activation Normal T cell Express Secreted
EGDS	Esofagogastroduodenoskopie
PBMNc	Imunokompetentní periferní krevní mononukleární buňky
antiTPO	Protilátky proti thyreoidální peroxidáze
antiTG	Protilátky proti thyreoglobulinu
antiTSH	Protilátky proti receptorům pro TSH
Le x, y	Lewis x, Lewis y
DM 1	Diabetes mellitus typu 1

## 1. Úvod

Autoimunita patologická je imunopatologický stav vedoucí k poškození vlastních orgánů a tkání. Autoimunitní onemocnění vznikají jako důsledek ztráty tolerance vůči vlastním strukturám při abnormální reakci na vnitřní antigeny (autoantigeny), kdy autoprotilátky nebo autoreaktivní T nebo B lymfocyty poškozují vlastní buňky či tkáň, ev. u endokrinopatií autoprotilátky stimulují nebo inhibují receptor pro hormon (např. Graves-Basedowova choroba) (22,34). Tolerance imunitního systému vůči vlastním tkáním se ustanovuje na centrální a na periferní úrovni. Na centrální úrovni se ustanovuje v thymu pro T lymfocyty a v kostní dřeni pro B lymfocyty. V thymu dochází k selekci autoreaktivních T lymfocytů s vysokou afinitou k vlastním autoantigenům. Tyto podléhají apoptóze. Do periferie se dostávají pouze autoreaktivní T lymfocyty s nízkou afinitou k vlastním antigenům a ty jsou drženy pod kontrolou mechanismy periferní tolerance (klonální delece, ignorace, anergie) (22,34). Klíčovou roli v navození centrální tolerance hraje gen AIRE – autoimunitní regulátor, jehož produktem je transkripční faktor regulující thymovou expresi tkáňově specifických antigenů. Mutace v tomto genu vede k vývoji Autoimunitního polyglandulárního syndromu typu 1 (34).

Nejčastější příčinou poruch štítné žlázy v oblastech s dostatečným přívodem jódu jsou v současné době právě autoimunitní onemocnění. Jejich prevalence a incidence stoupá v souvislosti s obecně se zvyšujícím výskytem autoimunitních a alergických chorob ve vyspělých zemích. Postihují především ženské pohlaví a výskyt se zvyšuje s věkem (22). Postižení i velmi nízkých věkových skupin dětí dnes není vzácností. Autoimunitní thyreopatie jsou řazeny mezi orgánově specifická autoimunitní onemocnění. V klinické praxi nesmíme zapomínat na jejich koincidenci s dalšími orgánovými i systémovými autoimunitními chorobami (22,34). Pozdní diagnostika v tomto případě může vést k akutnímu život

ohrožujícímu stavu (např. adrenální insuficience) nebo k poruše růstu a vývoje dítěte (např. nepoznaná celiakie).

Jako všechna autoimunitní onemocnění mají polyfaktoriální a polygenový základ, na jejich vzniku se účastní jak faktory vnitřní, tak zevní. Za hlavní vnitřní faktor vedoucí ke ztrátě autotolerance je považována genetická predispozice, ze zevních faktorů má největší podíl na indukci autoimunity infekční agens. Nejdůležitějším genetickým faktorem je polymorfismus hlavního histokompatibilního komplexu HLA. Kromě genů HLA systému se v rozvoji autoimunitní reakce mohou uplatnit defekty apoptotických genů (Fas/FasL) nebo polymorfismus pro některé kostimulační a cytoadhezivní molekuly (CTLA-4) (22,34). Mechanismem prolomení autotolerance infekčním agens je odkrytí skrytých autoantigenů při rozpadu buněk a tkání s následným rozvojem autoimunitní reakce, vznik neoantigenů pozměněním autoantigenů a dále mechanismus molekulární mimikry s molekulární homologií cizích mikroorganismů a složek vlastní tkáně, takže původně protiinfekční imunita přechází v autoimunitní reakci. Nejčastějším infekčním agens jsou viry (např. virus Epstein-Barrové), které se mohou uplatnit výše uvedenými mechanismy na indukci autoimunity. Z bakteriálních infekcí se poukazuje na vztah mezi gastrointestinálními patogeny a autoimunitními thyreopatiemi. Mezi nejvíce studované patogeny patří *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) a *Yersinia enterocolitica*. Kmen *Yersinia enterocolitica* je dáván do souvislosti s rozvojem Graves-Basedowovy tyreotoxikózy mechanismem molekulárních mimiker (molekulární homologie povrchových struktur mikroba a TSH receptoru). V etiopatogenezi autoimunitní thyreoiditidy může hrát roli infekce *H. pylori* (22,34).

## **2. Současný stav problematiky**

### **2.1 Juvenilní lymfocytární thyreoiditis**

#### **Charakteristika choroby**

Juvenilní lymfocytární thyreoiditis (JLT) je nejčastější orgánově specifické autoimunitní onemocnění u dětí. Současně se jedná o nejčastější autoimunitní onemocnění štítné žlázy s převahou postižení ženského pohlaví (95%). Prevalence autoimunitních onemocnění štítné žlázy je v populaci 5%, ženy středního a vyššího věku jsou postiženy až v 15%, u dětí je prevalence odhadována na 2-3 %. K rozvoji onemocnění dochází především v období adolescence, ale výskyt v předškolním věku není v současné době vzácností. JLT je nyní po eradikaci jódového deficitu v ČR nejčastější příčinou zjištěné strumy u dětí a získané primární hypofunkce štítné žlázy (22).

#### **Etiologie**

K rozvoji onemocnění dochází u geneticky disponovaného jedince, je známa asociace s geny 2. třídy hlavního histokompatibilního systému HLA -DR3, DR4 a DR5. Haplotyp DQA1\* 0301/DR4 a DQB1 \* 0201/DR3 disponuje jedince k rozvoji lymfocytární thyreoiditidy. Molekuly hlavního histokompatibilního systému HLA se exprimují na buněčných membránách buněk prezentujících antigen a určují odpověď T lymfocytů na specifické peptidy (22,34).

O genetické predispozici svědčí častý výskyt onemocnění i u několika členů jedné rodiny. Na spuštění této autoimunitní reakce se u geneticky disponovaného jedince podílí zevní a vnitřní faktory: z vnitřních faktorů jsou to vedle genetické predispozice hormonální

změny (rozvoj JLT hlavně v pubertě), **ze zevních faktorů především infekce (např. *Helicobacter pylori*, virus hepatitidy C, cytomegalovirus, virus Epstein a Barrové), fyzikální a chemické faktory (ionizující záření, volné radikály, kouření, z léků antiarytmikum Amiodaron s obsahem jódu, cytokiny, růstové faktory, analoga gonadoliberinu, dále chemické toxiny v prostředí- polychlorované bifenoly, pesticidy), stres, nutriční vlivy a zvýšený přívod jódu potravou (vzestup výskytu JLT po eradikaci jódového deficitu v ČR, při zvýšeném přísunu jódu se zvyšuje antigenicita thyreoglobulinu). Vyšší incidence autoimunitních chorob je pozorována u imunodeficitů převážně buněčných, ale i humorálních (22,34).**

Z hlediska etiopatogenetického se na vzniku autoimunity ve štítné žláze podílí cytokinová nerovnováha mezi pomocnými Th1/Th2 lymfocyty. U autoimunitní thyreoiditidy převažuje Th1 mediovaná imunitní odpověď s tvorbou IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-12 s aktivací makrofágů, NK buněk, cytotoxických T lymfocytů (buňkami zprostředkovaná imunitní odpověď) s destrukcí thyreocytů a s následnou poruchou tvorby a sekrece thyreoidálních hormonů. U Graves-Basedowovy choroby převažuje naopak Th2 imunitní odpověď s tvorbou IL -4, 5, 6, 10, 13 s aktivací B-lymfocytů s protilátkovou odpovědí. Cílovým antigenem je zde TSH receptor, proti kterému dochází k tvorbě stimulačních autoprotilátek (Graves-Basedowova toxikóza) nebo inhibujících autoprotilátek (forma atrofické thyreoiditidy s rozvojem těžké hypotyreózy). Cílovými antigeny u autoimunitní thyreoiditidy jsou thyreoglobulin, thyreoidální peroxidáza a natrium jodidový symportér. Imunogenicita thyreoglobulinu závisí na obsahu jódu, více jodovaný thyreoglobulin je více imunogenní. Morfologickým podkladem autoimunitních thyreopatií je lymfoplasmocytární infiltrace štítné žlázy (22,34).



## Klinický obraz

V klinickém obraze převažuje hypertrofická forma JLT s hmatnou zvětšenou štítnou žlázou u dětí. Atrofická forma autoimunitní thyreoiditidy, která je častá u dospělých pacientů, je v dětství vzácná. U těchto dětí není hmatná struma, jsou klinické a laboratorní známky těžké hypofunkce štítné žlázy včetně přítomného myxedému. **V dětském věku se nepoznaná těžká hypofunkce štítné žlázy vždy projeví také zástavou růstu a vývoje** kromě přítomné bradykardie, hypotenze, sníženého psychomotorického tempa a zmíněného myxedému (22)

**Obrázek 1,2.**

### ***Obrázek 1*** JLT- atrofická forma, myxedém

(vlastní materiál autora)



**Obrázek 2 JLT- atrofická forma, stejný pacient na léčbě, efekt terapie levothyroxinem**  
(vlastní materiál autora)



### **Diagnostika a léčba JLT**

Pro diagnózu JLT kromě uvedeného klinického obrazu svědčí přítomnost specifických autoprotilátek proti štítné žláze- protilátky proti thyreoidální peroxidáze (antiTPO) a/nebo proti thyreoglobulinu (antiTG), a nález na sonografii štítné žlázy (typicky snížená echogenita a nepravidelná textura štítné žlázy). Negativita autoprotilátek diagnózu JLT nevylučuje, v tomto případě se opíráme o typický sonografický nález **Obrázek 4,5**. Zejména u atrofických forem autoimunitní thyreoditidy mohou být přítomny protilátky proti receptorům pro TSH (blokuující antiTSH protilátky) (22,34,40). Tyto protilátky transplacentárně přenesené do plodu matky trpící tímto onemocněním pak mohou být příčinou přechodné formy primární kongenitální hypotyreózy při zablokování štítné žlázy u plodu (14).

U pacientů se sníženou funkcí štítné žlázy je nezbytná trvalá substituční terapie levothyroxinem. U pacientů s normální funkcí v době stanovení diagnózy JLT zahajujeme

tzv. izohormonální terapii malou dávkou levothyroxinu. Touto léčbou se zvyšuje aktivita tzv. regulačních T lymfocytů (Th3), které mají supresní vliv na vlastní autoimunitní proces, protože tlumí Th1 lymfocyty produkcí IL-10 (inhibice produkce IFN- $\gamma$ ) a TGF- $\beta$  (transformační růstový faktor beta, inhibice produkce IFN- $\gamma$  a proapoptický faktor) (22,34).

JLT může začít i v dětském věku přechodnou tyreotoxickou fází s klinickými známkami hyperfunkce štítné žlázy. Léčebně zde obvykle podáváme pouze beta blokátor, tyreostatická terapie není nutná, postupně dochází k přechodu do hypofunkce štítné žlázy (22).

**JLT je tedy většinou celoživotní onemocnění s trvalou substituční hormonální terapií, s nutností pravidelného sledování funkce štítné žlázy, se sonografickými kontrolami pro možný výskyt nádorového procesu ve štítné žláze (papilokarcinom, lymfom).** JLT je nutno vyhledávat aktivně u některých genetických syndromů, kde je popisován zvýšený výskyt (Turnerův syndrom, Downův syndrom, Klinefelterův syndrom), dále u pacientů s diabetes mellitus typu 1 (výskyt JLT ve 25%), ale i u dalších orgánových imunopatologických onemocnění (např. celiakie, idiopatické střevní záněty), u systémových imunopatologických onemocnění (systémový lupus erythematoses, sklerodermie **Obrázek 3**, juvenilní idiopatická artritida) a u autoimunitního polyglandulárního syndromu 1, 2 a 3 (22).

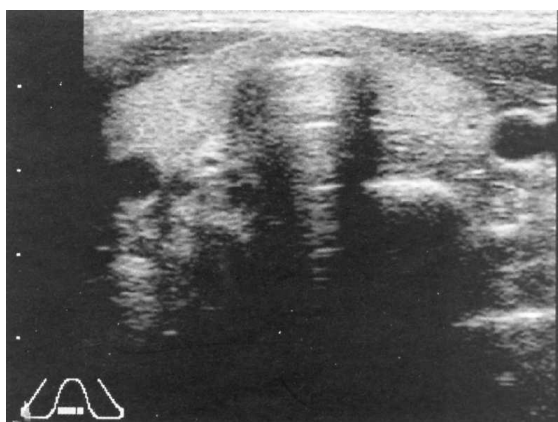
**Obrázek 3** Pacientka s JLT a cirkumskriptní formou sklerodermie

(vlastní materiál autora)



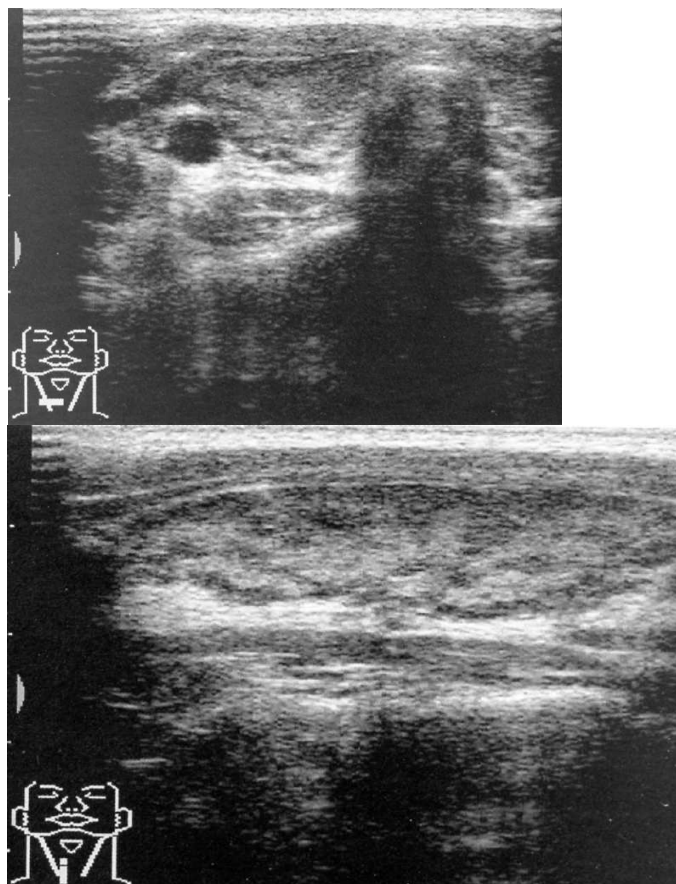
**Obrázek 4** Normální sonografický nález na štítné žláze s průměrnou echogenitou obou laloků, pravidelnou texturou, dobrým ohraničením laloků proti okolí

(převzato Lebl et al, Trendy soudobé pediatrie, Dětská endokrinologie, Galén 2004, s. 331)



**Obrázek 5** Typický sonografický obraz na štítné žláze u pacienta s JLT, snižená echogenita laloků, nepravidelná textura s hypoechogenními okrsky tkáně, špatné ohraničení žlázy proti okolí

(převzato Lebl et al, Trendy soudobé pediatrie, Dětská endokrinologie, Galén 2004, s. 332)



## 2.2 *H. pylori* infekce

*H. pylori* infikuje více jak polovinu celosvětové populace a patří mezi nejrozšířenější mikroby na celém světě.

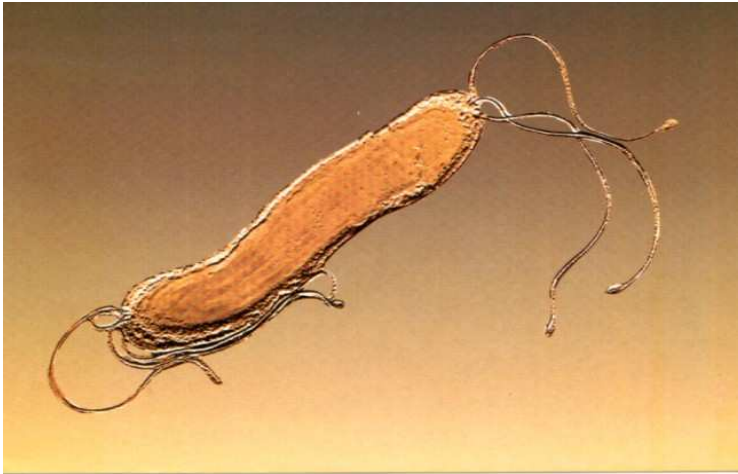
Dramatický rozvoj vědomostí o *H. pylori* v posledních 20 letech zcela zásadně změnil koncepci chorob spojených s infekcí *H. pylori* u dětí i dospělých. Byl objeven v roce 1982 Warrenem a Marshalllem, kteří za tento objev v roce 2005 získali Nobelovu cenu za lékařství (38).

K novým znalostem o infekci *H.pylori* u dětí je však třeba přistupovat trvale kriticky. K infekci dochází primárně již v dětském věku, obecné návrhy a doporučení z hlediska prevence, diagnostiky a léčby infikovaných dětí již byla v minulosti publikována, ale určitě nejsou definitivní. Dětský věk je na rozdíl od dospělého věku v mnoha ohledech specifickým obdobím s řadou odlišných okruhů problémů. **Obecně onemocnění gastroduodenální oblasti spojená s infekcí *H.pylori* zahrnují: chronickou gastritidu, peptické vředy, MALT (mucosal associated lymphoid tissue) lymfomy a žaludeční adenokarcinom.** Vředovou chorobu gastroduodenální je proto možné považovat za infekční onemocnění a eradikace *H. pylori* se tak stává kauzální terapií. Několik publikací potvrdilo vztah mezi chronickou *H. pylori* infekcí a sideropenickou anémií (38). Vliv *H. pylori* na gastroezofageální refluxní nemoc (GERD) a extradiigestivní choroby zůstává trvalým tématem k řešení. **V posledních letech se také věnuje pozornost vztahu mezi autoimunitními chorobami (diabetes mellitus, juvenilní lymfocytární thyreoiditis) a infekcí *H. pylori*** (8,11,15,25,38).

## Mikrobiologická charakteristika helikobakterů v žaludeční sliznici

*H. pylori* je gram-negativní, mikroaerofilní, spirální neinvazivní bakterie, o velikosti v průměru 3,5 x 0,6 um **Obrázek 6**. Patří mezi mikroby adaptované na dlouhodobé přežívání v agresivním žaludečním prostředí jak u člověka, tak u zvířat (*H. felis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. nemestrinae*, *H. acinonyx*). *H. pylori* je vybaven různými patogenetickými mechanismy. V čerstvých kulturách má typický spirálovitý tvar se třemi spirálami a bičiky (flagelami) lokalizovanými na jeden pól. Ty umožňují pohyblivost mikroba, která je jedním z jeho hlavních patogenetických mechanismů v kolonizaci žaludečního povrchu. Dalším patogenetickým mechanismem umožňujícím *H.pylori* přežití v kyselém žaludečním prostředí je ureáza, která hydrolyzuje endogenní ureu na bikarbonát a amoniak měnící pH v bezprostředním okolí mikroba v alkalické prostředí. Převážná část kmenů *H.pylori* obsahuje gen *vacA*, který ovlivňuje tvorbu cytotoxinu *vacA*, vakuolizujícího cytotoxinu, který je častěji spojen s duodenálními vředy. U většiny kmenů se také zjišťuje fragment genomu obsahující 29 genů a označovaný jako *cag*. Několik z nich kóduje sekreci proteinu *cag*, cytotoxické substance, která působí na hostitelské buňky a je těsně spjata s duodenálními vředy. V rozvoji chorob spojených s infekcí *H. pylori* jsou také důležité vlastnosti hostitelského organismu (38).

**Obrázek 6 Schématické znázornění *H. pylori***



*H. pylori* kolonizuje sliznici žaludečního typu (žaludek, Meckelův divertikl, žaludeční metaplazie v duodenu) a nachází se pouze v povrchovém hlenu (38). Vyskytuje se pouze na slizničním povrchu a uvnitř žaludečních žlázek v minimálním kontaktu s povrchem a neproniká do hlubších vrstev sliznice. V současnosti není úplně jasné, jakým způsobem poměrně neinvazivní mikrob může vyvolávat široké spektrum gastrointestinálních (GIT) i extragastrointestinálních onemocnění (38).

Molekulární biologie a mikrobiální genomika odhalila v posledních letech kompletní genetickou výbavu infekce *H. pylori*. *H. pylori* je jeden z více než 20 mikrobů, u kterých je známa kompletní genetická informace (38). Genom obsahuje více jak 1600 genů a byly definovány dva kmeny *H. pylori*. Znalost genomu umožnila s větší přesností rozšířit znalosti o metabolických pochodech a vzájemné interakci mezi *H. pylori* a člověkem. Vztah genotypu a fenotypu je nezbytný k pochopení mikrobiální kolonizace žaludečního povrchu, dlouhodobého přežívání v žaludku a rozvoji GIT i extradiigestivních onemocnění spojených s infekcí *H. pylori*. Je skutečně prokázáno, že zatím nepřesně určená část genů v genomu *H. pylori* se může exprimovat jen v kyselém žaludečním prostředí a je regulována různými zevními vlivy prostředí (38).



## **Epidemiologie a přenos *H.pylori***

*H. pylori* se vyskytuje po celém světě, prevalence vykazuje výrazné geografické odlišnosti, rozdíly mohou být také mezi různými populačními skupinami ve stejné zemi. Socioekonomické podmínky hrají s největší pravděpodobností hlavní roli v rozdílu ve výskytu infekce ve všech věkových skupinách. Prevalence infekce vykazuje významné rozdíly mezi průmyslově vyspělými a rozvojovými zeměmi (1,35,37,38).

Období, kdy dochází k získání infekce, je typicky dětský věk. Přesná doba jejího vzniku však dosud známa není. Na základě dosud uvedených údajů s největší pravděpodobností dochází k infekci již před 5. rokem života, byla zjištěna již v novorozeneckém a kojeneckém věku (38). Její výskyt postupně stoupá s věkem během celého dětství pravděpodobně v důsledku kohortového efektu. U dětí v rozvojových zemích mezi 2. až 8. rokem života je roční nárůst infekce asi 10%, zatímco údaje ze Severní Ameriky ukazují pouze 1% nárůst za rok. Protože infekce je získána typicky u dětí a je celoživotní, u velké části starších lidí (nad 60 let) je výskyt patologických změn dlouhodobým důsledkem infekce v dětství, kdy životní standard byl významně na nižší úrovni (35,37,38).

**Výskyt** infekce *H.pylori* je také odlišný v různých etnických skupinách (38). Genetické faktory asi nehrají roli v rozdílném výskytu mezi etnickými skupinami, avšak genetické faktory jsou důležité z hlediska interakce mezi infekcí a hostitelem a konečným důsledkem infekce pro lidský organizmus. V rozvojových zemích je prevalence již v dětském věku velmi vysoká a dosahuje až 90 %. Prevalence mezi dospělými středního věku je asi 80 % ve většině rozvojových zemích v porovnání s průmyslově vyspělými zeměmi, kde je 20-50 %. Vedle toho se způsob a rizikové faktory přenosu, stejně jako možnost reinfekce, pravděpodobně liší mezi rozvojovými a rozvinutými státy (37,38). Prevalence v rozvinutých

zemích se liší významně v závislosti na etnickém původu a věku. V německé studii byla zjištěna dechovým testem prevalence 9,4 % mezi dětmi ve věku 7-9 let. Němečtí žáci byli infikováni méně často (7,1 %) než žáci cizího původu (28,2 %). Ve studii z východního Švýcarska byla celková prevalence 6,5 % respektive 3,9 % u švýcarských dětí a 19,2 % u dětí rodičů, kteří se přistěhovali z oblastí s vysokým výskytem infekce *H. pylori*. V České republice u dětí ve věku 5-14 roků byla dechovým testem zjištěna celková prevalence *H. pylori* 30,6 %, mezi pohlavími nebyl prokázán statisticky významný rozdíl (38).

V dětském věku je spontánní vymizení infekce *H. pylori* ze žaludeční sliznice možné, kdy u kojenců a batolat může dojít k jejímu vymizení v prvních letech života (38). K tomu napomáhá velmi pravděpodobně i široké podávání antibiotik z jiných důvodů. *H. pylori* infekce u dospělých je chronická a nevymizí bez specifické terapie (38).

Obranné specifické mechanismy nejsou zcela známy a dokonce není úplně jasné, zda vůbec existují. *H. pylori* infekce neochrání ani před superinfekcí jinými mikroby, ani eradikace nezabrání reinfekci. Lidský imunitní systém pravděpodobně není vybaven mechanismy, kterými může bojovat proti lokalizaci infekce v žaludku. Optimální způsob ovlivnění imunity na populační úrovni je vakcinace. V současnosti však účinné očkování není k dispozici (38).

**Mechanismus šíření nákazy *H. pylori* infekce** je dle současných znalostí přenos mikroba z osoby na osobu fekálně-orální, orálně-orální nebo gastro-orální cestou, (intrafamiliární) již v časném věku. Je pravděpodobné, že těsný kontakt mezi jednotlivými členy domácnosti podporuje vzájemný přenos mikroba (38).

## Reakce organismu na *H. pylori*

*H. pylori* je unikátní mikrob kolonizující lidský žaludek, adaptovaný na přežívání v žaludečním prostředí a vyvolávající chronický zánět žaludeční sliznice (38). *H. pylori* je schopen vyhnout se působení imunitních mechanismů, vlivu žaludeční acidity a adhezí na žaludeční epitel si zajistit dostupnost živin (38). Produkuje řadu látek indukujících lokální zánětlivou odpověď, která zahrnuje reakci neutrofilů jako typický projev infekce *H. pylori*, dále T a B lymfocytů, plazmatických buněk, makrofágů a žírných buněk nebo apoptózu. Nepochází k invazi *H. pylori* do žaludeční sliznice, reakce organismu je pravděpodobně spouštěna primárně po vazbě *H. pylori* na epiteliální buňky asi vlivem mikrobiálních proteinů (38). Žaludeční epitel osob infikovaných *H. pylori* obsahuje zvýšené množství cytokinů. Hlavní roli má pravděpodobně IL-8, který aktivuje chemotaxi neutrofilních leukocytů. Důležitou roli hraje také neutrofilový aktivující protein (NAP). ***H. pylori* indukuje mohutnou systémovou a slizniční imunitní odpověď.** Produkce protilátek však nevede k eradikaci infekce, ale může přispívat k tkáňovému poškození. Kyslíkové nebo dusíkaté radikály se také podílí na poškození sliznice při chronické *H. pylori* infekci a předpokládá se, že infekce může ovlivnit rozvoj rakoviny žaludku změnou DNA mechanismem oxidativního stresu (38). U části dětí zjišťujeme také autoimunitní ukazatele, kdy prokazujeme protilátky proti parietálním buňkám žaludeční sliznice (9,18,20,28,38).

## Choroby vyvolané *H. pylori*

**GIT-** v rámci gastrointestinálního traktu

Klinický průběh infekce je velmi variabilní a je ovlivněn jak mikrobiálními, tak vlastnostmi hostitelského organismu. Všechny dlouhodobé důsledky nákazy *H. pylori* získané v dětském věku na lidský organismus nejsou dosud známy (38).

Akutní infekce způsobuje přechodnou pangastritidu s hypoaciditou a jen ojediněle je diagnostikována (38).

**Chronická gastritida se vyvine v podstatě u všech trvale kolonizovaných dětí, ale u 80-90 % pacientů se neobjeví žádné symptomy. Bylo zjištěno, že i u trvale bezpříznakových infikovaných dětí dochází progresivně ke zhoršování histologických projevů v žaludeční sliznici (38).** Charakter gastritidy koreluje s rizikem rozvoje klinických projevů, hlavně duodenálních nebo žaludečních vředů, slizniční atrofie, intestinální metaplazie, žaludečního MALT lymfomu nebo adenokarcinomu žaludku. Od roku 1994 je *H. pylori* označen Světovou zdravotnickou organizací (WHO) jako kancerogen I.třídy. ***H. pylori* je také dáván do možné souvislosti s různými extra GIT symptomy** (38).

#### **Extra-GIT (extragastrointestinální) symptomy**

Může se jednat o sideropenickou anémii i bez současného krvácení do trávicího traktu a idiopatickou trombopenickou purpurou (ITP). Další extra GIT choroby, u kterých se předpokládá působení infekce *H. pylori*, jsou diabetes mellitus typu 1, autoimunitní thyreoiditida a hepatitida, idiopatické střevní záněty (idiopatická prokolitida, Crohnova choroba), kožní choroby různého charakteru (rosacea, urtica, alopecia areata), onemocnění kardiovaskulárního systému, Raynaudův fenomén, syndrom náhlého úmrtí kojence, neurologické choroby (migréna), Henoch-Schönleinova purpura, angioedém, alergie, malnutrice, růstová retardace a recidivující respirační infekty (otitis media) (8,11,15,25,38).

#### **Praktické hledisko diagnostiky infekce *H. pylori***

Současné obecné indikace pro stanovení infekce *H. pylori* a doporučené diagnostické metody vyplývají ze závěrů mezinárodních pracovních skupin (38). Vyšetřování *H. pylori* by mělo být součástí komplexní vyšetřovací strategie. Stanovení infekce by mělo být provedeno

pouze v případě, že uvažujeme o následné antiinfekční léčbě. U dětí by mělo být provedeno endoskopické vyšetření a stanovení *H. pylori* v případě symptomů podezřelých z organického onemocnění. Hlavním cílem vyšetřování by měla být hlavně identifikace příčiny symptomů než pouze vlastní detekce infekce. Uvažuje se o vyšetření a léčbě rodinných členů u dříve infikovaných a úspěšně eradikovaných dětí. Tento postup se jeví jako logicky ospravedlněný, jednoznačně však není potvrzeno, že vyšetření a terapie *H.pylori* u příslušníků rodiny sníží riziko reinfekce u dítěte po úspěšné eradikaci (38).

*H. pylori* infekce může být diagnostikována přímo invazivními metodami (endoskopie s biopsií žaludeční sliznice, nebo nepřímo neinvazivními testy (stanovení antigenu *H. pylori* ve stolici, sérologická diagnostika, dechový test). V dětském věku je snaha používat neinvazivní testy, které mají dostatečnou výpovědní hodnotu pro využití v běžné klinické praxi (35,38).

Volba nejvhodnější metody stanovení infekce *H. pylori* závisí na klinických okolnostech, např. také může jít o situaci, kdy se snažíme zjistit vztah mezi určitými symptomy a infekcí *H. pylori*.

## **Neinvazivní testy**

### **Stanovení antigenu *H. pylori* ve stolici**

Jedná se o neinvazivní metodu vhodnou právě pro dětskou populaci (35,37,38,39). Tento diagnostický postup je vhodný pro děti všech věkových skupin, protože není nutná spolupráce pacienta a ukazuje se, že je dobře použitelný i pro děti mladší 6 roků. Stanovení je založeno na metodě ELISA za použití polyklonálních nebo monoklonálních protilátek. V současnosti se dává obecně přednost novým generacím testů využívajících monoklonální protilátky. Tyto testy byly v Evropě již obecně doporučeny jako součást standardních

vyšetřovacích postupů u dětí s podezřením na infekci *H. pylori* (35,37,38). Naše nedávno publikované zkušenosti se stanovením infekce *H. pylori* v České republice pomocí dostupného testu s monoklonálními protilátkami potvrdily přesnost a spolehlivost neinvazivní metody stanovení *H. pylori* ve stolici u dětí (HpSTAR, DAKO Cytomation) (35,39). **Stanovení antigenu *H. pylori* ve stolici pomocí monoklonálních protilátek je velmi přesná, jednoduchá metoda jak pro primární detekci infekce, tak pro monitorování úspěšnosti léčby u dětí s dyspeptickými obtížemi. Toto vyšetření má vysokou specifitu (> 92%) a senzitivitu (> 95%) (35,38,39).**

### **Dechový test**

Jedná se o metodu vhodnou k počáteční diagnostice kolonizace žaludeční sliznice a sledování úspěšnosti eradikační léčby. Test je založen na nepřímém stanovení aktivity ureázy v závislosti na infekci *H. pylori* v žaludeční sliznici s vysokou specificitou a senzitivitou. Po požití označené urey (13-C) dochází k hydrolýze a uvolněný CO<sub>2</sub> je analyzován ve vydechaném vzduchu. Dechový test vyžaduje spolupráci dítěte, je poměrně spolehlivý u starších dětí (38).

### **Sérologická diagnostika**

Je to poměrně levná a široce používaná metoda v klinické praxi, i když v řadě aspektů kontroverzní. Vzhledem ke geografické odlišnosti *H.pylori* je nutná místní verifikace sérologických metod v dětském věku. K diagnostice se používají testy ELISA. Westernblott umožňuje přesnější stanovení infekce a současně **lze identifikovat jednotlivé antigenní struktury (cagA, vacA). Sérologické metody neumožňují identifikovat aktivní infekci ani**

**nejsou vhodné ke kontrole úspěšnosti léčby.** V současné době se serologické metody používají jen v epidemiologických studiích, pro běžnou klinickou praxi jsou nevhodné (38).

## **Invazivní diagnostické testy**

### **Testy invazivní**

Testy invazivní (endoskopie s biopsií žaludeční sliznice, speciální barvení bioptických vzorků, ureázový test ze žaludeční sliznice, bakteriologie, PCR reakce, fluoresceinové hybridizační testy-FISH) diagnostikují přímo jak infekci, tak i současné organické onemocnění vyvolané *H. pylori*. Přímé metody zůstávají zlatým standardem diagnostiky. Bioptické vzorky poskytují spolehlivou diagnostiku infekce *H. pylori* a současně umožní i histologické vyšetření žaludeční tkáně (gastritidy, gastropatie) (38).

**Bakteriologie s kultivací mikroba** ze žaludeční sliznice a současné **stanovení citlivosti na antibiotika** je již běžně rutinně používaná metoda ve spolupráci s mikrobiologickým pracovištěm Ústavu mikrobiologie FN a LF UK v Plzni.

### **Vyšetření citlivosti *Helicobacter pylori* k antibiotikům**

Vyšetření citlivosti *H. pylori* k antibiotikům není v klinicko-mikrobiologických laboratořích ČR obvykle rutinně prováděno, ale na našem pracovišti je běžně používané (E-testy) (40). V literatuře lze nalézt údaje o **vzrůstající rezistenci této bakterie k antibiotikům**, která se může výrazně podílet na neúčinnosti léčby infekcí způsobených *H. pylori*. Rezistence vůči klarithromycinu je udávána v 21 %, vůči amoxicillinu je vzácná (40).

**Ureázový test** stanovuje přímo aktivitu ureázy produkované *H. pylori* v žaludeční sliznici, je součástí běžného vyšetření bioptických vzorků. Výsledek se hodnotí podle barevné změny indikátoru po uložení vzorku žaludeční sliznice do prostředí s ureou. **Metody PCR, molekulárně genetické nebo imunologické** slouží k přesné identifikaci kmenů *H. pylori* a **byly rozpracovány v Ústavu mikrobiologie FN a LF UK v Plzni.**

## **Terapie**

Terapie by měla být podána pouze po přesné diagnostice onemocnění vyvolané *H. pylori*. **Evropská doporučení v tomto případě indikují eradikační léčbu pouze u biopticky prokázané aktivní *H. pylori* pozitivní chronické gastritidy s klinickými projevy** (38). Léčba není všeobecně indikována při chybění aktivní infekce nebo klinické symptomatologie. Za prokázanou aktivní infekci se považuje buď přímý histologický nebo bakteriologický průkaz. Obecně je doporučována eradikace v dětském věku u peptických vředů a MALT lymfomů *H. pylori* pozitivních (38). Endoskopické vyšetření s odběrem bioptických vzorků je nezbytné provést u všech dětí, u kterých je zamýšlena terapie. Léčba je také doporučována u dětí s některými extra GIT symptomy (sideropenická anemie). Očkování proti *H. pylori* bylo poměrně úspěšné u zvířat, ale použití u člověka je zatím obtížné a nebylo dosud zavedeno do klinické praxe (38).

Současně doporučená léčebná schémata u dětí se obecně skládají z blokátoru protonové pumpy v kombinaci s antibiotiky (klarithromycin, amoxycillin nebo metronidazol). Nejpoužívanější v Evropě je schéma založené na trojkombinaci antisekrečního léku (omeprazol, lansoprazol) (1-2mg/kg/den) s dvěma antibiotiky, klarithromycin (15 mg/kg/den), a amoxycillin (50 mg/kg/den) rozdělené do dvou denních dávek a podávání 7 dní (38).



V současnosti je praktickým problémem již zmíněná stoupající rezistence na klarithromycin a výběr léků pro sekundární eradikační terapii po selhání primární eradikační léčby. V klinických studiích byla již také prokázána účinnost probiotik v terapii infekce *H.pylori* u dětí a dospělých (38,40).

### 2.3 Vztah mezi juvenilní lymfocytární thyreoiditidou a infekcí *H. pylori*

*H. pylori* je důležitý gastroduodenální patogen u dětí a dospělých. Je příčinou primární chronické gastritidy, žaludečních a duodenálních vředů, MALT lymfomů u dětí a dospělých a karcinomu žaludku u dospělých. *H. pylori* vyvolává jak lokální, tak systémovou imunitní reakci (38). Infekce *H. pylori* je většinou získána v dětství a obvykle bez specifické terapie přetrvává celý život. Až 90% pacientů dětského věku s touto infekcí je asymptomatických. Možná role infekce *H. pylori* v iniciaci autoimunity je široce diskutována, ale zůstává nejednoznačná. Guariso a spolupracovníci (18) ve své studii upozornili na vztah mezi infekcí *H. pylori* u dětí a přítomností orgánově specifických autoprotilátek bez klinických a laboratorních známek onemocnění. Domnívají se, že infekce *H. pylori* v dětství by mohla být trigrem autoimunitní gastritidy a/nebo autoimunitního onemocnění. Nejsou jednotné názory na vztah autoimunitní thyreoiditidy a současné infekce *H. pylori*. Někteří jsou pro příčinnou souvislost mezi infekcí *H. pylori* a autoimunitní thyreoiditidou (11,15,21), někteří jsou proti (27,41). Bertalot popsal pokles titru antithyreoidálních autoprotilátek po eradikaci infekce *H. pylori*. Šterzl a spolupracovníci zkoumali prevalenci protilátek proti *H. pylori* u pacientů s izolovanou autoimunitní thyreoiditidou (AT) a AT v rámci polyglandulární autoimunity a u zdravých kontrol (32,33). Vyšší prevalence byla zjištěna u pacientů s izolovanou AT než u pacientů s APS (32,33). Manifestace onemocnění závisí na faktorech virulence *H. pylori* (VacA cytotoxin, CagA protein, ureáza) a genetické predispozici hostitele. Pacienti s *H. pylori* pozitivní gastritidou produkují široké spektrum antigastrických protilátek zaměřených proti různým antigenům (1,12,18,42,43). Mezi těmito antigeny hrají významnou roli Lewis antigeny druhé třídy tj. Lewis x a Lewis y (Le x, y), které jsou exprimovány na beta řetězci žaludeční protonové pumpy a dále na žaludečním mucinu. Obdobné antigeny exprimuje *H. pylori* na svém povrchu jako součást lipopolysacharidu. *H. pylori* stimuluje tvorbu autoprotilátek zaměřených proti Lewis antigenům, které jsou však zároveň exprimovány

žaludeční sliznicí. Mechanismus molekulárních mimiker je tedy zavzat do patogeneze gastritidy, a to zvláště atrofické. Lewis antigeny x a y jsou také součástí krevní skupiny Lewis. Tyto antigeny jsou exprimovány na povrchu erytrocytů, dále na krevních a synoviálních granulocytech, jak již zmíněno v zažívacím traktu na žaludeční sliznici, ale i v kolon, v epiteliálních buňkách štítné žlázy a pankreatu (23,30, 31).

**Nejedná se tedy o přímé poškození tkáně štítné žlázy bakterií, ale předpokladem je možná zkřížená reaktivita mezi společnými antigeny *H. pylori* a antigeny štítné žlázy, tedy mechanismus molekulární mimikry plynoucí z podobnosti antigenní struktury mikroba s antigenními strukturami vlastními, v tomto případě štítné žlázy. Původně protiinfekční imunita tedy přechází v autoimunitní reakci. Těmito společnými antigeny se jeví právě Lewis antigeny x,y.**

## 2.4 Cytokiny a chemokiny

Jedná se o početnou skupinu látek, zejména glykoproteinů a proteinů, s funkcí lokálních hormonů. Parakrinním nebo autokrinním způsobem ovlivňují směr, intenzitu a dobu trvání imunitních a zánětlivých odpovědí. Cytokiny jsou propojené do sítě, která zodpovídá za mezibuněčnou komunikaci v rámci imunitního systému, ale také za výměnu informací mezi imunitním systémem a ostatními systémy organismu. Mezi hlavní skupiny cytokinů patří lymfokiny, interleukiny, interferony, faktory nekrotizující nádory, faktory stimulující růst kolonií, transformační růstové faktory, stresové proteiny a chemokiny. Buněčný původ cytokinů je širokospektrý, mohou to být buňky aktivované při zpracování antigenu, např. makrofágy nebo dendritické buňky. Nejpodrobněji je známá tvorba cytokinů subpopulacemi T buněk a to Th (pomocnými) a Tc (cytotoxickými) lymfocyty (22,34).

Buněčnou imunitu kontrolují především cytokiny secernované subpopulací **Th1 pomocných lymfocytů** - **interleukin -2 (IL-2), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), nádory nekrotizující faktor beta (TNF- $\beta$ ) a interleukin-12 (IL-12)** s aktivací makrofágů, NK buněk, cytotoxických T lymfocytů. Tento typ buněčné autoimunitní odpovědi s destrukcí cílového orgánu se uplatňuje u juvenilní lymfocytární thyreoiditidy (22,34).

**Th2 pomocné lymfocyty** secernují **IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13** a uplatňují se v humorálním typu imunitní odpovědi s aktivací eozinofilů, B lymfocytů. Tento typ humorální autoimunitní odpovědi s tvorbou specifických autoprotilátek se uplatňuje z thyreopatií u Graves-Basedowovy choroby a u varianty atrofické thyreoiditidy (22,34).

Důležitou roli hrají **regulační Th3 lymfocyty** produkující **transformační růstový faktor beta (TGF- $\beta$ ) a IL-10**, které mají imunosupresivní funkci svým působením na Th1 lymfocyty. IL-10 inhibuje produkci IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  inhibuje také produkci IFN- $\gamma$  a současně působí jako proapoptotický faktor (22,34).

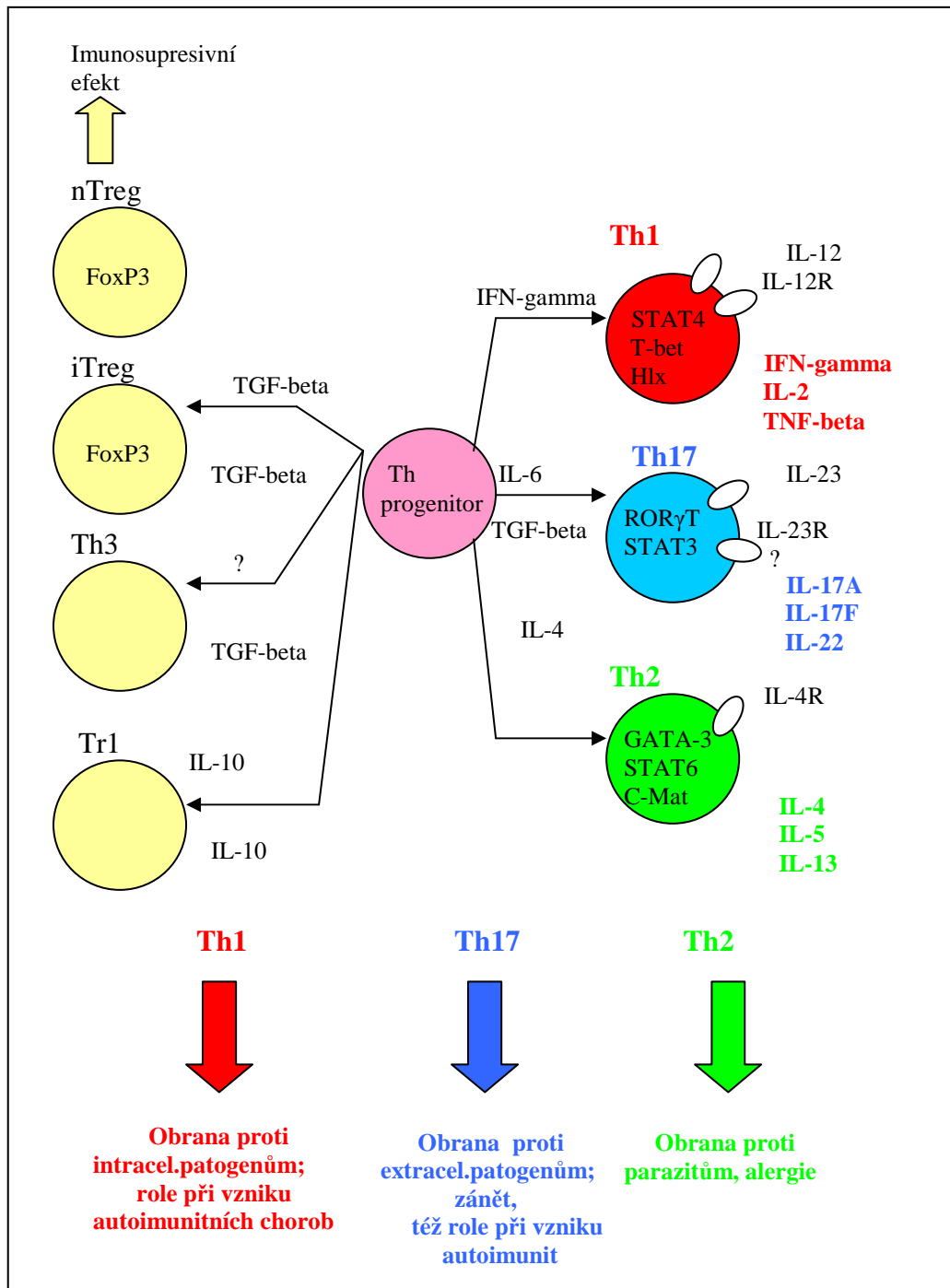
**Prozánětlivé cytokiny:** IL-1,-6, Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ )

**IL-1** je prozánětlivý cytokin produkovaný hlavně v mononukleárních fagocytech, stimuluje proliferaci T a B lymfocytů, působí jako endogenní pyrogen, působí na chemotaxi neutrofilů, makrofágů a lymfocytů, na cytotoxickou aktivitu NK buněk. **IL-6** je prozánětlivý cytokin syntetizovaný Th2 lymfocyty, makrofágy, endotelovými buňkami, fibroblasty a žírnými buňkami, působí jako endogenní pyrogen a aktivátor syntézy proteinů akutní fáze v hepatocytech. **Nádory nekrotizující faktor (TNF- $\alpha$ )** má cytotoxický a cytostatický efekt na některé nádorové buňky, silný prozánětlivý a proapoptotický účinek, působí jako endogenní pyrogen. Je produkován hlavně makrofágy a monocyty, ale také lymfocyty, NK buňkami a žírnými buňkami.

**Recentně byly popsány tzv. Th17 lymfocyty, které se mohou patogeneticky podílet na vzniku autoimunitních chorob a uvažuje se i o existenci tzv.Th9 lymfocytů (47).**

**Obrázek 7 Dělení a vývoj CD4+ lymfocytů. Polarizace imunitní odpovědi.**

(převzato z Bettelli a kol., 2007, doplněno podle Bettelli a Kuchroo, 2005)



**Chemokiny** (chemotaktické cytokiny) patří mezi cytokiny působící jako chemotaktické faktory pro různé leukocyty a působí také jako aktivátory cytokinů. Produkují je prakticky všechny buňky a jejich tvorbu indikuje infekční agens, exogenní iritační látky a mnohé cytokiny. Mají důležité prozánětlivé a regulační aktivity. Mezi chemokiny patří např. **IL-8**, **neutrofilní aktivační protein 2** (NAP-2), které jsou chemotaktickými a aktivačními faktory především pro neutrofile (přitahují je do místa zánětu). Dalšími chemokiny se stejným působením jsou **Growth Regulated Oncogene (GRO)**, Growth Regulated Oncogene alpha (GROalpha). **Monocytový chemotaktický protein (MCP-1,-2,-3)** přitahuje monocyty do místa zánětu, **RANTES** (Regulated upon Activation Normal T cell Express Secreted) působí chemotakticky na T lymfocyty a monocyty.

**Růstové faktory:** Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF). Jedná se o stimulační faktory pro granulocyty a makrofágy. **IL-7** je růstovým faktorem T lymfocytů, aktivuje makrofágy.

### 3. Cíl studie

#### 3.1

Prvním cílem studie bylo zjistit frekvenci současného výskytu infekce *Helicobacter pylori* u souboru dětí s juvenilní lymfocytární thyreoiditidou a porovnat ji s prevalencí této infekce u souboru stejně starých, ale zdravých dětí.

**V této části jsme navazovali na grant IGA MZ ČR NI 7399-3/2003 „Epidemiologie infekce *Helicobacter pylori* v České republice v dětském věku (1-15 roků)“, hlavní řešitel doc. MUDr. Josef Sýkora, Ph.D., spoluřešitel MUDr. Renata Pomahačová, hodnocení – A).**

#### 3.2

Druhým cílem studie byl rozbor našeho souboru pacientů s juvenilní lymfocytární thyreoiditidou z hlediska zastoupení pohlaví, věkového rozložení souboru, funkce štítné žlázy a positivity autoprotilátek proti štítné žláze v době stanovení diagnózy JLT, přidružených dalších autoimunitních chorob, positivity rodinné anamnézy z hlediska výskytu autoimunitních chorob a počtu sourozeneckých dvojic s autoimunitními chorobami.

#### 3.3.

Třetím cílem bylo posoudit imunologickou reaktivitu u pacientů s JLT *H. pylori* pozitivních a negativních a u zdravých kontrol *H. pylori* pozitivních a negativních stanovením množství a spektra produkovaných cytokinů a chemokinů bazálně a po stimulaci krevních mononukleárních buněk lyzátem *H. pylori* a jeho antigeny metodou proteinové microarray.

**Infekcí *H. pylori* a současnou autoimunitní thyreoiditidou s ohledem na možnou**

**stimulační roli mikroba a jeho lipopolysacharidu na imunokompetentní periferní krevní mononukleární buňky se v domácí ani v zahraniční literatuře dosud se nikdo nezabýval. Tato problematika byla řešena grantem IGA MZ ČR NR 887-3/2006 ukončeným v r. 2008, hlavní řešitel MUDr. Renata Pomahačová, spoluřešitel doc. MUDr. Kateřina Štechová, Ph.D., hodnocení - A).**



## 4. Metodika

### 4.1. Diagnóza juvenilní lymfocytární thyreoiditidy

Diagnóza choroby byla stanovena na podkladě klinického obrazu (struma a/nebo klinické příznaky poruchy funkce štítné žlázy), pozitivitu specifických autoprotilátek proti thyreoidální peroxidáze (antiTPO) a/nebo proti thyreoglobulinu (antiTG) a na podkladě ultrazvukového vyšetření štítné žlázy (snížená echogenita a nepravidelná textura štítné žlázy).

### 4.2. Diagnóza *H. pylori* infekce

U všech dětí s JLT byl **proveden neinvazivní diagnostický test přítomnosti antigenu *H. pylori* ve stolici** (Amplified IDEIQA HpStAR ELISA, DakoCytomation, Glostrup, Denmark), který s vysokou specifitou (> 92%) a senzitivitou (> 95%) pomáhá k detekci zmíněné infekce (39). Děti s pozitivním nálezem tohoto testu byly podrobeny, po obdržení informovaného souhlasu zákonných zástupců, **invazivní diagnostice infekce *H. pylori* – gastroscopickému vyšetření**, s cílem potvrdit infekci *H. pylori* bakteriologickým vyšetřením, zjistit rozsah a stupeň gastroduodenálního postižení, izolovat kmeny *H. pylori* a stanovit jejich mikrobiologické charakteristiky (citlivost na antibiotika, extrakce antigenů *H. pylori* k jejich využití při imunologických studiích). Na základě výsledků invazivních vyšetření byly děti s pozitivní infekcí *H. pylori* indikovány k eradikační terapii.

## **Stanovení antigenu *H.pylori* ve stolici ( ELISA monoklonální protilátky)**

U každého dítěte byl získán čtvrtý vzorek stolice a zamražen na - 20<sup>0</sup> C pro následnou analýzu. Detekce aktivní infekce *H.pylori* byla stanovena za použití ELISA testu (Dako Cytomation, Glostrup, Dánsko) dle doporučeného postupu výrobcem.

## **Stanovení infekce *H. pylori* ve stolici**

IDEIATM HpStAR DAKO Connex GmbH, Martinsried, Německo

- Amplifikovaný enzymoimunoanalytický test (ELISA)
  - imunoanalytická technologie
- Přímá neinvazivní detekce antigenů *H. pylori* ve vzorcích lidské stolice
- Monoklonální protilátky (reprodukovatelnost)
  - Detekční limit (5 femtomolů antigenů *H. pylori* /gram stolice)
  - intra a inter-assay koeficienty
  - zkřížená reaktivita (neprokázána u 37 mikrobů)
- Stanovení (čerstvé nebo zamražené vzorky)
  - 2 dny bez chlazení
  - 72 hodin 2 - 8°C
  - -20°C až -80°C (dlouhodobě)

## **Postup stanovení**

Stanovení bylo provedeno dle doporučení výrobce

- mikrotitrační jamky (monoklonální protilátky)
- Supernatant stolice (0.1g) + konjugát protilátek (křenová peroxidáza)
- (pozitivní, negativní kontrola)
- inkubace 60±5 min (sendvičový komplex)

- Tetramethylbenzidin (modré zbravení stop roztok žluté)

### **Interpretace výsledků**

- optická denzita (OD) spektrofotometricky 450/650nm
- pozitivní negativní kontrola
- Absorbance při dvou vlnových délkách (450 vs referenční 650nm)
  - 0.150 pozitivní
  - < 0.150 negativní

### **4.3. Příprava celobuněčného antigenu a bakteriálního lipopolysacharidu (směsi Lewis antigenů) *H. pylori*, které byly dále použity pro imunologickou stimulaci krevních mononukleárních buněk jedinců s JLT**

#### **Extrakce antigenů *H. pylori***

(Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D., Ústav mikrobiologie FN Plzeň)

Antigenní struktura lipopolysacharidu *H. pylori* je shodná s tzv. Lewis antigeny. U různých kmenů této bakterie byly popsány čtyři typy těchto antigenů - Lewis X, Lewis Y, Lewis a, Lewis b. Dílčím cílem projektu byla izolace antigenů, které by byly použity pro další imunologické studie.

Byly připraveny následující antigeny:

- 1) celobuněčný antigen formaldehydem usmrcených a fixovaných buněk,
- 2) přečištěný lipopolysacharidový extrakt.

## ***Postup přípravy antigenů***

### *Kultivační médium (brucelový bujon se suplementem antibiotik):*

- Brucella broth (Difco Laboratories, Detroit, USA), 5% boviní sérum
- □suplementum antibiotik: amphotericin B, 2,5 mg/l; vankomycin, 10 mg/l;
- □trimethoprim, 5 mg/l; polymyxin B, 2500 IU/l (Sigma, St. Louis, U.S.A.)

### *Kultivace:*

- □k inokulaci byla použita 72hodinová kultura *H. pylori* kultivovaná na selektivním médiu,
- □10 ml brucelového bujonu s přídavkem suplementu antibiotik inokulovány plnou kličkou kultury každého kmene,
- □kultivace v bujónu při 37 °C v atmosféře s 10% CO<sub>2</sub> po dobu 48 hodin.
- □bylo použito celkem 8 náhodně vybraných kmenů izolovaných od pacientů z oblasti Plzeňského kraje
- □pro přípravu antigenů byla použita směsná kultura vzniklá smísením kultur (výsledný objem 80 ml)

### *Příprava celobuněčného antigenu:*

- ke vzorku byl přidán formaldehyd do výsledné koncentrace 1%, směs byla inkubována 1 hodinu při 35 °C,
- buňky byly získány centrifugací (10 000 × g, 10 min),
- následně promyty 3 × pufovaným fyziologickým roztokem (PBS),
- koncentrace buněk byla upravena na hodnotu 10<sup>6</sup> buněk/ml, uchovávána při 80°C.

### *Příprava purifikovaného lipopolysacharidového antigenu:*

- Extrakce byla provedena metodou popsanou Luchim a Morrisonem (2000),
- k 5 g bakteriální kultury (váženo ve vlhkém stavu) bylo přidáno 5 ml 90% vodou nasyceného fenolu, inkubováno 30 minut při 68 °C,
- vodná fáze byla odebrána a dialyzována 24 hodin při 4 °C (voda 4× vyměněna),
- dialyzát byl lyofilizován a uchováván při 4 °C.

Kvalita izolovaného antigenu byla ověřena SDS-PAGE elektroforézou s přidavkem 8 M močoviny a následnou detekcí stříbrem.

#### **4.4 Využití metodiky proteinové microarray ke stanovení množství a spektra produkovaných cytokinů bazálně a po stimulaci krevních mononukleárních buněk lyzátem *H. pylori* a jeho antigeny (lipopolysacharidem - LPS)**

##### **Izolace imunokompetentních periferních krevních mononukleárních buněk (PBMNc)**

(doc. MUDr. Kateřina Štechová, Ph.D., Laboratoř autoimunitních onemocnění, Pediatriká klinika FN Praha-Motol)

Krevní mononukleární buňky byly izolovány z heparinizované periferní žilní krve studovaných jedinců s JLT *H. pylori* pozitivních, negativních a zdravých kontrol metodou hustotní gradientové centrifugace na Ficollu. Imunologická reaktivita byla pak posuzována stanovením jejich bazální produkce cytokinů a chemokinů a po stimulaci lyzátem *H. pylori* a jeho LPS metodou proteinové microarray.

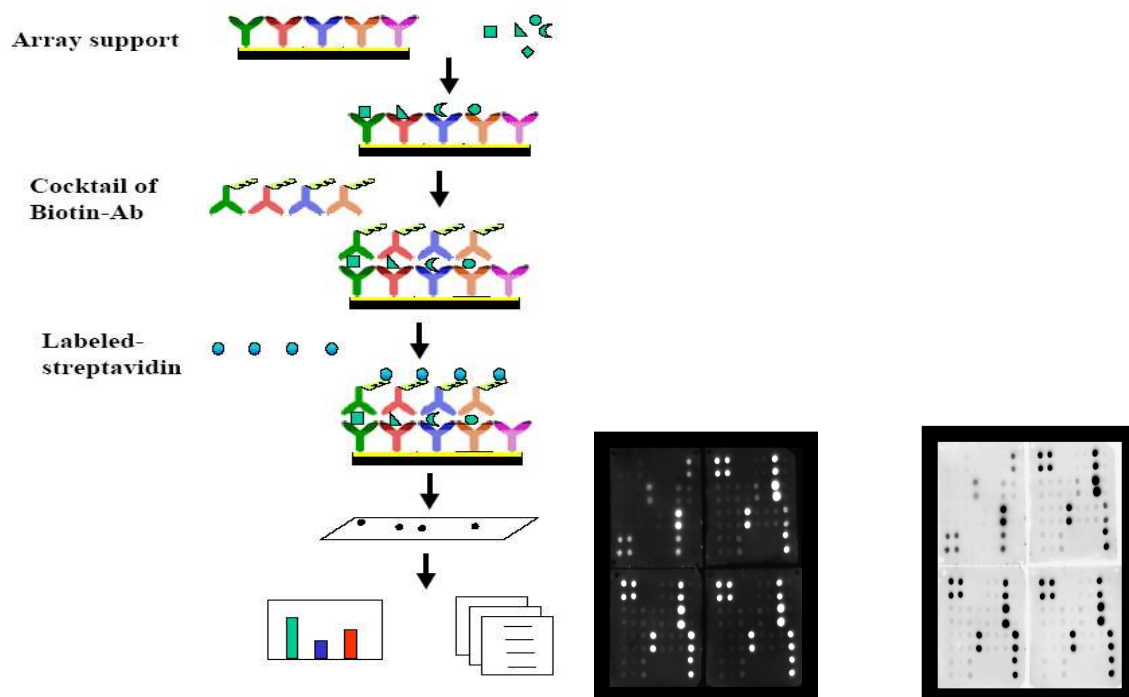
## Metodika proteinové microarray

(doc. MUDr. Kateřina Štechová, Ph.D., Laboratoř autoimunitních onemocnění, Pediatriká klinika FN Praha-Motol)

Jde o vysoce moderní semikvantitativní techniku dostatečně citlivou ke stanovení stovek antigenů v různých biologických materiálech. Princip metody: Na membráně jsou navázány primární anticytokinové protilátky, dochází k vazbě cytokinu a tato vazba je následně ožejměna vazbou sekundární protilátky spojené s detekčním systémem. Následuje vyvolání barevné reakce, jejíž intenzita odpovídá množství stanovovaného cytokinu **Obrázek 8**. V rámci řešení projektu byla tato metodika použita k vyšetření 23 cytokinů a chemokinů uvolňovaných z izolovaných imunokompetentních periferních krevních mononukleárních buněk k posouzení jejich reaktivity vůči bakteriálním antigenům.

### Obrázek 8 Schéma proteinové microarray

(převzato, Laboratoř autoimunitních onemocnění, Pediatriká klinika FN Praha-Motol)



### **Spektrum 23 cytokinů a chemokinů konkrétně obsahovalo:**

**Th1 cytokiny:** interleukin -2 (IL), Interferon gamma (IFN-gamma), Tumor Necrosis Factor beta (TNF-beta)

**Th2 cytokiny:** IL-5,IL-13

**Th3 cytokiny:** IL-10, Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta)

**Prozánětlivé faktory:** IL-1,-6, Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-alpha)

**Růstové faktory a ostatní cytokiny:** Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF), IL-3, IL-7, IL-15

**Chemokiny:** Growth Regulated Oncogene (GRO), Growth Regulated Oncogene alpha (GROalpha), IL-8, Monocyte Chemoattractant Proteins (MCP)-1,-2,-3, Monokine-induced by Interferon gamma (MIG), Regulated upon Activation Normal T cell Express Secreted (RANTES)

Detekční limity pro cytokiny jsou prezentovány na webových stránkách výrobce ([www.raybiotech.com](http://www.raybiotech.com)). Protein microarray výsledky byly ověřeny testem ELISA (Bender MedSystems™, Vienna, Austria) a Quantibody array (RayBiotech, Norcross, U.S.A.).

Produkce důležitého cytokinu ze skupiny Th2 IL-4 byla stanovena výhradně metodou ELISA, protože není standardní součástí komerčně dostupných protein array kitů.

### **Statistická analýza**

Pro porovnání tří a více skupin byl použit Kruskal-Wallis test. Pro porovnání dvou skupin mezi sebou byl použit Mann-Whitney test. Wilcoxon Signed Ranks Test byl použit v každé skupině pro porovnání bazální produkce cytokinů a chemokinů a po stimulaci lyzátem

*H. pylori* a jeho LPS. Pro zjištění závislosti byl použit Spearmanův koeficient. Hladina významnosti  $p < 0.05$  byla považována za statisticky významnou.



## **5. Výsledky**

### **5.1 Soubor, metodika, výsledky a závěr (Cíl 3.1 )**

**Frekvence současného výskytu infekce *Helicobacter pylori* u souboru dětí s juvenilní lymfocytární thyreoiditidou a její porovnání s prevalencí této infekce u souboru stejně starých, ale zdravých dětí.**

#### **5.1.1 Soubor**

##### **Soubor – JLT**

V rámci řešení projektu bylo v letech 2006-2008 vyšetřeno v dětské endokrinologické ordinaci Dětské kliniky FN a LF UK v Plzni celkem 199 dětí s juvenilní lymfocytární thyreoiditidou (JLT). Ve shodě s literárními zdroji převažovalo ve skupině ženské pohlaví 167 dívek (83,9%) a 32 chlapců (16,1%).

##### **Soubor - kontrolní skupina**

Soubor kontrolní skupiny tvořilo 1545 asymptomatických dětí ve věku 0 – 15 roků ze stejné geografické oblasti žijící v různých oblastech (město, vesnice). Velikost vzorku a síla statistického zhodnocení byla kalkulována před zahájením studie. Do této studie byly zařazeny děti prospektivním způsobem. Abychom získali co největší statistickou sílu, všechny děti kontrolní skupiny byly rozděleny do 16 věkových skupin, abychom mohli zhodnotit věkovou specifickou prevalenci infekce *H.pylori* ; 0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6,6-7, 7-8, 8-9, 9-10,10-11,11-12,12-13,13-14,14-15, 15-16 roků. Současně byly u všech dětí získány socio - demografické údaje. U všech dětí byl získán vzorek stolice ke stanovení bakteriální

kolonizace žaludeční sliznice pomocí ELISA testu za použití monoklonálních protilátek. Rodiče nebo zákonní zástupci doplnili dotazník za použití stejných kritérií.

Dle obecných mezinárodních doporučení, všechny možné faktory, které by mohly ovlivnit přesnost testu ze stolice byly brány do úvahy. Všechny děti byly zjevně zdravé a neměly žádné známky akutní nebo chronické choroby. Vylučovací kritéria ze studie byla; užívání antibiotik, antisekreční léčby, prokinetik, vizmutových preparátů nebo protizánětlivých léků 2 měsíce před odběrem vzorků stolice. Ze studie byly dále vyřazeny děti s akutním nebo chronickým onemocněním žaludku, abdominálním chirurgickým zákrokem, mentálním onemocněním nebo jakýmkoliv údajem o předchozí eradikaci infekce *H. pylori*.

**Soubor kontrolní skupiny byl součástí grantového projektu IGA MZ ČR (NI 7399-3/2003) zaměřeného na sledování prevalence infekce *H. pylori* u zdravých českých asymptomatických dětí a výsledky byly publikovány v roce 2009 v časopise „*Helicobacter*“ (37).**

### 5.1.2 Metodika

Diagnóza JLT u dětí byla stanovena na podkladě pozitivitu specifických autoprotilátek proti thyreoidální peroxidáze (antiTPO) a/nebo proti thyreoglobulinu (antiTG) a na podkladě ultrazvukového vyšetření štítné žlázy (snížená echogenita a nepravidelná textura štítné žlázy). U všech dětí s JLT byl poté proveden neinvazivní diagnostický test přítomnosti antigenu *H. pylori* ve stolici (Amplified IDEIQA HpStAR ELISA, DakoCytomation, Glostrup, Denmark), který s vysokou specifitou a senzitivitou pomáhá k detekci zmíněné infekce (viz neinvazivní diagnostika infekce *H. pylori*) (37,39). Děti s pozitivním nálezem tohoto testu byly podrobeny, po obdržení informovaného souhlasu zákonných zástupců, diagnostickým vyšetřením (viz invazivní diagnostika infekce *H. pylori*,

esofagogastroduodenoskopie- EGDS) s cílem zjistit rozsah a stupeň gastroduodenálního postižení, izolovat kmeny *H. pylori* a stanovit jejich mikrobiologické charakteristiky (citlivost na antibiotika, extrakce antigenů *H. pylori* k jejich využití při imunologických studiích). Na základě výsledků invazivních vyšetření byly děti s pozitivní infekcí *H. pylori* indikovány k eradikační terapii (viz terapie infekce *H. pylori*).

### 5.1.3 Výsledky

#### JLT

Ze 199 vyšetřených dětí byla infekce *H. pylori* potvrzena u 15 dětí (14 dívek a 1 chlapec), tj. v 7,5%. Průměrný věk těchto dětí byl  $11,2 \pm 2,3$  let. Klinická hypotyreóza byla přítomná u 3 dětí, u 3 dětí se jednalo o subklinickou hypotyreózu, ostatní děti měly normální funkci štítné žlázy v době stanovení diagnózy JLT (TSH  $21,7 \pm 20,7$  mIU/l – N 0,30-4,0, fT4  $10,2 \pm 4,8$  pmol/l – N 11,5 – 23, autoprotilátky antiTPO  $306 \pm 592$  IU/ml – N do 60, antiTG  $722 \pm 1051$  IU/ml – N do 60, antiTSH u všech pacientů negativní). 3 pacienti měli atrofickou formu JLT, přišli s klinickými známkami těžké hypotyreózy včetně myxedému, ostatní pacienti měli hypertrofickou formu JLT. Sonograficky u dvou pacientů byla přítomná lalůčkovitá přestavba žlázy, v ostatních případech snížená echogenita žlázy s nepravidelnou texturou. 7 dětí podstoupilo gastrokopické vyšetření, které potvrdilo chronickou aktivní gastritidu. Pouze u 3 dětí byly přítomné gastrointestinální potíže při *H. pylori* infekci, ostatní děti byly asymptomatické. Charakteristika souboru uvedena v **Tabulce 1**.

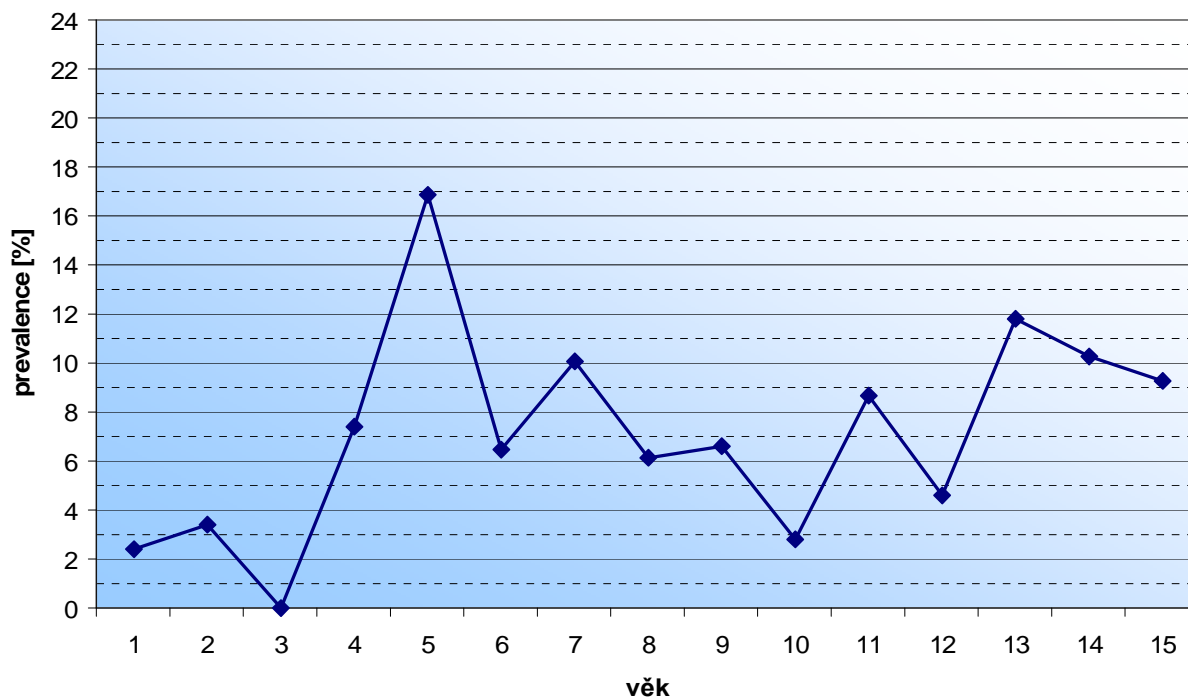
## Kontrolní asymptomatická skupina

Ze skupiny asymptomatické pediatrické populace (městské, vesnické), 110 dětí z 1545 bylo klasifikováno jako *H. pylori* pozitivní, ukazující na celkovou prevalenci aktivní infekce *H. pylori* (7,1%). Souhrn prevalence *H. pylori* podle věkových skupin je uveden v **Grafu 1**. *H.pylori* prevalence byla signifikantně závislá na věku (  $\chi^2$  pro trend, p.001) (37). Podobné zvýšení bylo zjištěno u obou pohlaví. Žádný statisticky významný rozdíl nebyl zjištěn mezi dívkami a chlapci (8,4% vs. 5,9%), ani nebyl zjištěn žádný rozdíl mezi pohlavím v jednotlivých věkových skupinách (37). Vzhledem k věkově specifické závislosti prevalence infekce bylo současně provedeno srovnání s věkově odpovídající kontrolní skupinou (10-13 roků), kde prevalence infekce *H. pylori* dosáhla 8,2 % a nebyla také signifikantně odlišná od prevalence infekce *H. pylori* v JLT skupině dětí.

Nezávislé rizikové faktory asociované s infekcí *H. pylori* v naší dětské populaci byly (37): počet dětí v domácnosti ( OR 4.26; CI 1.91-9.80), neuplné vzdělání otce ( OR 0.23; CI 0.18-0.34) a dlouhodobý pobyt v ústavu (ústavní péče), (OR6.83;CI 2.25-26.50).

**Graf 1**

Standardizovaná prevalence infekce *Helicobacter pylori* podle věkových skupin  
chi<sup>2</sup> pro trend (věk vs. prevalence) p=.001



**Tabulka 1** Charakteristika souboru dětí s JLT *H. pylori* pozitivních

Počet pacientů	15
Pohlaví (dívky/chlapci)	14/1
Průměrný věk (roky) ± SD	11,2 ± 2,3
Funkce štítné žlázy	
Normální	9
Subklinická hypofunkce (TSH 4,2-10 mIU/l)	3
Klinická hypofunkce (TSH > 10 mIU/l)	3
Průměrná hodnota TSH (N 0,3-4 mIU/l) ± SD	21,7 ± 20,7
Průměrná hodnota fT4 (N 11,5-23 pmol/l) ± SD	10,2 ± 4,8
Průměrná hodnota aTPO (N < 60 IU/ml) ± SD	306 ± 592
Průměrná hodnota aTG (N < 60 IU/ml) ± SD	722 ± 1051
Protilátky aTSH	0
Forma tyreoiditidy (hypertrofická/atrofická)	12/3
Manifestní gastrointestinální potíže	3
Počet EGDS	7

#### 5.1.4 Závěr

**Ze 199 dětí s JLT byla u 15 nemocných potvrzena aktivní infekce *H. pylori*, tj. šlo o 7,5 % infikovaných dětí.** Ve skupině asymptomatických dětí, které byly součástí našeho grantu IGA MZ ČR (NI 7399-3/2003) zaměřeného na sledování prevalence infekce *H. pylori* u zdravých českých dětí byla infekce potvrzena u 110 z 1545 dětí (110/1545), 7,1%. Ze skupiny infikovaných dětí, 5,8% dětí žila v rodinách ve všeobecné populaci. Byla zjištěna pozitivní asociace s věkem, ale bez závislosti na pohlaví a výskyt infekce byl častější u dětí žijících v nepříznivých socioekonomických podmínkách

**Celková prevalence infekce *H.pylori* v dětském věku je 7,1 % a ukazuje na to, že výskyt infekce *H.pylori* v asymptomatické dětské populaci je srovnatelný s výskytem infekce *H. pylori* u pacientů s JLT. Vzhledem k věkově specifické závislosti prevalence infekce *H. pylori* v dětské populaci bylo současně provedeno srovnání s věkově odpovídající kontrolní skupinou (10-13 roků), kde prevalence infekce *H.pylori* dosáhla 8,2 % a nebyla také signifikantně odlišná od prevalence infekce *H.pylori* v JLT skupině dětí.**

### 5.1.5 Diskuse

Infekce *H. pylori* je celosvětově nejrozšířenější infekcí u člověka a infikuje asi polovinu celosvětové populace s nejvyšší prevalencí v rozvojových zemích, kde dosahuje v dětském věku až 90% a mezi dospělými středního věku asi 80%. V průmyslově vyspělých zemích je prevalence odhadována mezi 20-50% (35,37,38).

*H. pylori* se považuje za hlavní příčinu primární chronické gastritidy, žaludečních a duodenálních vředů, MALT lymfomů u dětí i dospělých a žaludeční rakoviny v dospělosti. Považuje se také za možnou příčinu některých extragastrointestinálních chorob (sideropenická anémie, idiopatická trombocytopenická purpura, diabetes mellitus, autoimunitní thyreoiditida a hepatitida, idiopatické střevní záněty, urtika, alopecia areata, Henoch-Schönleinova purpura, angioedém) (8,11,15,25,38). Ačkoliv je infekce získána v dětském věku, většina těchto dětí je asymptomatických (až 90%). Primoinfekce souvisí se socioekonomickými podmínkami populace. U jedinců žijících v lepších socioekonomických podmínkách k primoinfekci dochází později, pokud k ní vůbec dojde (1,38).

Prevalence infekce *H. pylori* v České republice u asymptomatické dětské populace od 0 do 15 let věku je relativně nízká 7,1% a patří mezi nejnižší v Evropě (37). V rámci této studie o prevalenci infekce *H. pylori* v České republice u asymptomatické dětské populace od 0 do 15 let věku jsme vyšetřili v ČR celkem 1545 asymptomatických dětí od 0 do 15 let věku, zastoupení chlapců bylo 49,3%. Výskyt infekce před 4. rokem života byl v této studii velmi nízký (0,5%). Prevalence infekce *H. pylori* v dětském věku se v naší dětské populaci od 1. roku života do období dospívání 15 let postupně signifikantně zvyšuje v závislosti na věku v důsledku kohortového efektu (37). Poměrně nízká prevalence odráží údaje z dalších vyspělých zemí a potvrzuje klesající trend výskytu infekce *H. pylori* pravděpodobně v závislosti na zlepšujících se sociálně-ekonomických a hygienických podmínkách v rodinách v

České republice (37). Jiná je situace mezi českými dětmi s klinickými symptomy (nonulcerózní dyspepsií), kde je prevalence této infekce přibližně 25% (36). V této studii autoři také potvrdili vyšší pozitivitu infekce *H. pylori* ve skupině dětí právě s nízkou socioekonomickou úrovní (36), což bylo dále potvrzeno v poslední epidemiologické studii (37).

Autoimunitní gastritida je orgánově specifické autoimunitní onemocnění charakterizované přítomností protilátek proti parietálním buňkám. Cílovým autoantigenem je H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPáza lokalizovaná intracelulárně a na apikální membráně žaludečních parietálních buněk. Již dřívější práce se zabývaly rolí chronické infekce *H. pylori* v rozvoji autoimunitní gastritidy. Byl nalezen vztah mezi atrofickou gastritidou a infekcí *H. pylori* (20) a zkřížená reaktivita mezi *H. pylori* a žaludeční sliznicí (9). U pacientů s pozitivními protilátkami proti parietálním buňkám byla častěji zjišťována aktivní infekce *H. pylori* oproti zdravým kontrolám (28). Guariso a spol. zjistili statisticky významný vztah mezi infekcí *H. pylori* u dětí a přítomností protilátek proti parietálním buňkám v jejich séru (18). Aspinall a spol. upozornili na to, že infekce *H. pylori* může být trigrem gastrické autoimunity mechanismem molekulární mimikry mezi lipopolysacharidem *H. pylori* a Lewis antigeny exprimovanými na epitelálních buňkách žaludeční sliznice (2).

Již v některých dřívějších pracích byla patogenetická role *H. pylori* přisuzována některým extragastrointestinálním onemocněním včetně autoimunitních onemocnění jako autoimunitní thyreoiditida, Sjögrenův syndrom, diabetes mellitus a autoimunitní trombocytopenická purpura (8, 11, 15). Emilia a spol. upozornili na normalizaci trombocytopenie u idiopatické trombocytopenické purpury po eradikaci infekce *H. pylori* (13). Marollo a spol. publikovali zvýšenou prevalenci infekce *H. pylori* u pacientů s diabetes mellitus typu 1 (25). Existuje několik studií o přítomnosti gastrických a dalších orgánově specifických autoprotilátek u dětí s infekcí *H. pylori*. Barrio a spol. našel protilátky proti



parietálních buňkách u 6% dětí a mladých dospělých s inzulín-dependentním diabetes mellitus a infekcí *H. pylori* (3). Guariso a spol. porovnali prevalenci orgánově specifických autoprotilátek u skupiny 56 pacientů s infekcí *H. pylori* potvrzenou gastrokopickým vyšetřením se skupinou 68 dětí, u kterých byla infekce při gastrokopickém vyšetření vyloučena. Průměrný věk v této studii byl 10,5 roku (medián 4-19). Všichni pacienti byli testováni na přítomnost protilátek proti parietálním buňkám, vnitřnímu faktoru, thyreoglobulinu, kůře nadledvin, pankreatu (dekarboxyláza kyseliny glutamové). Frekvence orgánově specifických autoprotilátek byla vyšší u skupiny dětí s pozitivní infekcí *H. pylori*. Statisticky významně byly zvýšené především protilátky proti parietálním buňkám u skupiny dětí s pozitivní infekcí *H. pylori*. V této skupině byly s vyšší frekvencí zjištěny také thyreoidální a pankreatické autoprotilátky, i když rozdíly nebyly statisticky signifikantní. Přítomnost autoprotilátek nebyla spojena s klinickými příznaky onemocnění a s hormonálními změnami (18). Orgánově specifická autoimunitní onemocnění jsou chronická onemocnění s dlouhým preklinickým obdobím charakterizovaným přítomností specifických autoprotilátek. Guariso a spol. si kladou otázku serologického vývoje specifických autoprotilátek po eradikaci infekce *H. pylori*, zda eradikace infekce může zastavit klinický vývoj autoimunitní gastritidy a/nebo dalších autoimunitních onemocnění (18).

O výskytu infekce *H. pylori* mezi dětmi s JLT je známo velmi málo. V italské studii (21) potvrdili infekci *H. pylori* u dětí s JLT ve 26,7 % (pozitivita hodnocena na podkladě přítomnosti cirkulujících protilátek proti *H. pylori* detekovaných ELISA testem založeným na monoklonální protilátce proti 64-kDA specifickému antigenu *H. pylori*). Další dostupná studie u dětí ukázala sérologickou pozitivitu protilátek proti *H. pylori* (IgG protilátky měřeny ELISA testem) u dětí s JLT ve 20,9% (29).

V našem souboru 199 dětí s JLT byla potvrzena aktivní infekce *H. pylori* u 15 pacientů vyšetřením přítomnosti antigenu *H. pylori* ve stolici (HpSTAR, DAKO Cytomation,

metoda založená na monoklonálních protilátkách), tj. šlo o 7,5 % infikovaných dětí. Výsledek je tedy srovnatelný a nevykazuje významné odlišnosti s prevalencí této chronické infekce u zdravé dětské české populace od 0 do 15 let věku, která je 7,1% (37).

## 5.2 Soubor, metodika, výsledky a závěr (Cíl 3.2 )

**Rozbor našeho souboru pacientů s juvenilní lymfocytární thyreoiditidou z hlediska zastoupení pohlaví, věkového rozložení souboru, funkce štítné žlázy a positivity autoprotilátek proti štítné žláze v době stanovení diagnózy JLT, přidružených dalších autoimunitních chorob, positivity rodinné anamnézy z hlediska výskytu autoimunitních chorob a počtu sourozeneckých dvojic s autoimunitními chorobami.**

### 5.2.1 Soubor

V současné době je evidováno v endokrinologické ordinaci Dětské kliniky FN a LF UK Plzeň celkem 270 pacientů s thyreopatiemi. V souboru jednoznačně převažují autoimunitní thyreopatie u 246 dětí (15 dětí Graves-Basedowova choroba, 231 dětí JLT), pouze malou složku souboru v počtu 24 dětí tvoří pacienti s kongenitální hypotyreózou

**Graf 2.** S chorobami štítné žlázy z nedostatku jódu se již v současné době nesetkáváme.

Ve skupině dětí s kongenitální hypotyreózou ve shodě s literárními údaji převažují pacienti s dysgenezí štítné žlázy v 15 případech (62,5%), u 6 dětí je přítomna dyshormonogeneze štítné žlázy. Ve 3 případech se jednalo o přechodnou formu kongenitální hypotyreózy v důsledku zablokování štítné žlázy plodu přenesenými blokujícími antiTSH protilátkami od matek, které trpěly atrofickou formou chronické lymfocytární thyreoiditidy. Léčba levothyroxinem u těchto dětí byla pouze přechodná do 2-3 měsíců věku, kdy jsme mohli s klesající hladinou antiTSH protilátek u dětí léčbu postupně ukončit. Přítomnost vysokých titrů blokujících antiTSH protilátek byla zjištěna u matek až v souvislosti s pátráním po etiologii kongenitální hypotyreózy u jejich dětí.

### 5.2.2 Metodika

Diagnóza JLT byla stanovena na podkladě positivity specifických autoprotilátek proti thyreoidální peroxidáze (antiTPO) a/nebo proti thyreoglobulinu (antiTG) a na podkladě ultrazvukového vyšetření štítné žlázy (snížená echogenita a nepravidelná textura štítné žlázy). V 95% případů byl prvním příznakem vedoucím k diagnóze JLT v našem souboru palpační nález suspektní strumy.

### 5.2.3 Výsledky

Ve skupině 231 dětí s JLT bylo 178 pacientů ženského **pohlaví** (77%) a 53 mužského pohlaví (23%) **Graf 3**. Věkové rozložení souboru dětí s JLT v době stanovení diagnózy: 0-10 let 79 dětí (34%), z toho do 6 let 14 dětí (6%), 11-18 let 152 dětí (66%) **Graf 4**. Nejmladší pacient s JLT v souboru byl 3 letý a v době stanovení diagnózy v tomto věku byla již přítomna těžká hypotyreóza (TSH 45,0 mIU/l, N 0,3-4).

Z hlediska **funkce štítné žlázy** v době stanovení diagnózy JLT mělo hypofunkci štítné žlázy 137 dětí (59,3%), 91 pacientů (39,4%) mělo normální funkci štítné žlázy a 3 pacienti (1,3%) začali přechodnou tyreotoxickou fází s postupným přechodem do hypotyreózy **Graf 5**. 72 pacientů (52,6%) s hypofunkcí štítné žlázy měli hypofunkci subklinickou (TSH 4,2-10 mIU/l) a 65 pacientů (47,4%) hypofunkci klinickou, z toho 30 dětí (46%) mělo v době stanovení diagnózy TSH > 50 mIU/l, klinicky přítomný myxedém a stoupající tělesná hmotnost, u 8 dětí byla současně přítomna porucha růstu se zpomalením růstového tempa při těžké hypotyreóze, u 2 dětí byl patrný jednoznačný vliv pozdní diagnózy na jejich finální výšku). 5 dětí s touto

těžkou hypotyreózou mělo atrofickou formu thyreoiditidy, blokuující antiTSH protilátky byly negativní.

Z hlediska **pozitivity autoprotilátek proti štítné žláze** v době stanovení diagnózy JLT byla u 140 pacientů (60,6%) přítomna pozitivita jak antiTPO, tak antiTG autoprotilátek. U 47 dětí byly přítomny pozitivní pouze antiTG autoprotilátky (20,3%) a u 36 dětí přítomny pozitivní pouze antiTPO autoprotilátky (15,6%). 8 pacientů (3,5%) mělo autoprotilátky proti štítné žláze negativní, přítomna struma s hypofunkcí štítné žlázy, sonografický nález jednoznačný z autoimunitního procesu (snížená echogenita, nepravidelná textura štítné žlázy s hypoechogenními okrsky tkáně) **Graf 6.**

Pozitivní **alergická anamnéza** u pacientů s JLT byla přítomna u 56 dětí našeho souboru 231 dětí (24,2%). V 95% případů se jednalo o polyvalentní alergii **Graf 10.**

103 dětí (44,6%) z 231 pacientů mělo pozitivní **rodinnou anamnézu autoimunitní choroby** u rodiče, prarodiče nebo u sourozence. Pouze ve 3 případech (1,3%) bylo autoimunitní chorobou u rodiče nebo prarodiče postiženo mužské pohlaví. V 74 případech (71,8%) byla u rodiče nebo prarodiče přítomna chronická lymfocytární thyreoiditis, v 16 případech (15,5%) Graves-Basedowova choroba, ve 12,7% jiná autoimunitní choroba (systémový lupus erythematoses, revmatoidní artritida, celiakie, diabetes mellitus typu 1, vitiligo) **Graf 7.**

V souboru 231 dětí s JLT mělo 17 pacientů (7,4%) **sourozence s autoimunitním onemocněním Graf 8.** Nejčastější autoimunitní chorobou byla u sourozenců JLT. **Tabulka 2** uvádí přehled všech autoimunitních chorob u sourozenců pacientů s JLT.

**Přidružené autoimunitní onemocnění** v souboru 231 dětí s JLT bylo přítomno u 35 pacientů (15,2%) **Graf 9.** Přehled přidružených autoimunitních onemocnění uvádí **Tabulka 3.** U dvou pacientů byla stanovena diagnóza Autoimunitního polyglandulárního syndromu typu 2 a 3 (APS 2, APS 3). U pacienta s APS 2 byla nejprve diagnostikována akutní adrenální insuficience v 17 letech věku, po zahájení substituce glukokortikoidy a mineralokortikoidy se

manifestoval diabetes mellitus typu 1, současně byla přítomna JLT se subklinickou hypofunkcí štítné žlázy. Vysoké protilátky proti 21- hydroxyláze potvrdily autoimunitní adrenalitidu. U pacienta s APS 3 se nejprve manifestovala totální alopecie a JLT, po několika letech se manifestoval diabetes mellitus typu 1.

## 5.2.4 Diskuse

Ve shodě s literárními údaji (22) i v našem souboru 231 **dětí s JLT převažovalo jednoznačně postižení u ženského pohlaví**. Tuto skutečnost dále potvrzuje rozbor rodinného výskytu autoimunitních chorob u našich pacientů s JLT, kdy ve 100 případech byl postižen rodič nebo prarodič ženského pohlaví, pouze ve 3 případech se jednalo o jedince mužského pohlaví.

24% našich pacientů mělo **pozitivní alergickou anamnézu** potvrzující genetickou dispozici k imunopatologickým reakcím u těchto jedinců. Tato skutečnost by měla mít dopad do klinické praxe, to znamená u jedinců s pozitivní alergickou anamnézou myslet na možný vývoj autoimunitní imunopatologické reakce.

3,5 % našich pacientů s JLT mělo negativní autoprotilátky proti štítné žláze, což diagnózu JLT nevylučuje. Z našich klinických zkušeností vyplývá **význam vyšetřování přítomnosti antiTSH protilátek (blokujících) u pacientů s JLT ženského pohlaví**. Tito jedinci mají většinou atrofickou formu tyreoiditidy s těžkou hypotyreózou (22,40). Transplacentárně přenesené antiTSH protilátky blokují štítnou žlázu u plodu v průběhu celé gravidity, takže plody jsou plně závislé trvale na saturaci tyroxinem od matek, které mají substituční terapii při hypotyreóze (14). Tyto ženy s pozitivními blokujícími antiTSH protilátkami by proto měly být důsledně dispenzarizovány po celou graviditu z hlediska adekvátní substituční terapie a v tomto směru by měly být poučeny o nezbytnosti jejich adekvátní léčby pro normální vývoj plodu. U těchto žen v graviditě můžeme také predikovat možnost přechodné formy kongenitální hypotyreózy u jejich dětí a diagnózu potvrdit vyšetřením TSH přímo z pupečnickové krve novorozence a časněji tak postnatálně zahájit substituci levothyroxinem. Tato léčba je pouze přechodná v souvislosti s postupnou eliminací přenesených antiTSH protilátek u dítěte (14). V našem souboru 24 dětí s kongenitální

hypotyreózou jsme tuto přechodnou formu kongenitální hypotyreózy diagnostikovali u 3 dětí (12,5%). Ve všech případech přítomnost blokujících antiTSH protilátek u těchto žen v graviditě nebyla diagnostikována. Ke konečné diagnóze s potvrzením vysokých titrů blokujících antiTSH protilátek ( $> 40,0$  IU/ml, N do 1,5 IU/ml) u matek a jejich dětí nás vedla až anamnéza těžké hypotyreózy při atrofické formě autoimunitní thyreoiditidy u matek novorozenců. Z našich klinických zkušeností vyplývá doporučení vyšetřovat antiTSH protilátky u žen s autoimunitní thyreoiditidou na začátku gravidity.

Důležitým údajem v našem souboru je zjištění **vysoké frekvence výskytu autoimunitních onemocnění v rodinách našich pacientů s JLT (44,6%)**. Záchyt těžké primární hypofunkce štítné žlázy u několika dětí byl v rodinách s jasnou genetickou dispozicí k autoimunitním onemocněním. Z toho jednoznačně plyne **otázka dispenzarizace jedinců v takto postižených rodinách**. Pozdní diagnóza těžké primární hypotyreózy v dětském věku se negativně projeví na růstu a vývoji dítěte s možnými trvalými následky. My sami jsme pozorovali ve dvou případech vliv pozdní diagnózy těžké primární hypotyreózy na finální výšku dětí. Diagnóza primární hypotyreózy u těchto dětí byla pozdní, kdy při zpětném vyhodnocení růstové křivky v době periody stabilního dětského růstu po dobu několika let bylo patrné zpomalení a postupně až zástava růstu těchto dětí. Po normalizaci funkce štítné žlázy došlo k růstové akceleraci, ale současně pro tyto pacienty k nepříznivě časnému nástupu izosexuální puberty. V současné době máme možnost u těchto pacientů s nepříznivou růstovou prognózou blokovat centrální izosexuální pubertu analogy gonadoliberinu a zlepšit tak růstovou prognózu dětí. Na našem pracovišti nyní blokujeme centrální izosexuální pubertu u jednoho chlapce s touto problematikou. V klinické praxi je nezbytné této situaci předcházet správnou monitorací růstu dětí s časným odhalením příčiny růstové poruchy.



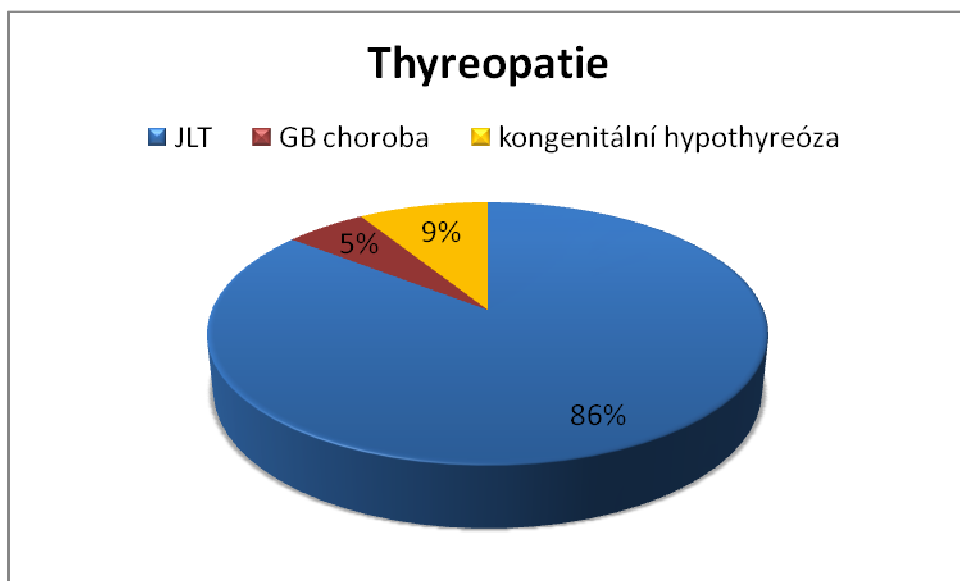
Nejčastěji se vyskytujícími autoimunitními chorobami v rodinách našich pacientů byla chronická lymfocytární thyreoiditis téměř v 72% a Graves-Basedowova choroba v 15,5%, stejně tak u sourozenců našich pacientů se také nejčastěji vyskytovala JLT. Tedy i v našem souboru dokladujeme **nejčastější výskyt autoimunitních onemocnění štítné žlázy z autoimunitních onemocnění (22).**

**35 pacientů (15,2%) z 231 dětí mělo přidružené autoimunitní onemocnění.** Ve 13 případech se primárně diagnostikovalo jiné autoimunitní onemocnění i neendokrinních orgánů, až po té s odstupem i několika let byla stanovena diagnóza JLT. U pacientů s diabetes mellitus typu 1 obecně cíleně pátráme po přítomnosti JLT a celiakie. Zkušenosti na našem pracovišti potvrzují nutnost aktivního vyhledávání JLT u pacientů s chronickými střevními záněty. V souboru našich 32 pacientů s chronickými střevními záněty (19 pacientů s m. Crohn, 13 pacientů s colitis ulcerosa) jsme stanovili diagnózu JLT již se subklinickou hypotyreózou u 3 pacientů (9,4%). U pacientů s vývojem dvou autoimunitních onemocnění (např. JLT, vitiligo) je dle našich klinických zkušeností tyto **pacienty důležité sledovat z hlediska vývoje další možné autoimunitní choroby nejen klinicky, ale i laboratorně (sledování vývoje orgánově specifických autoprotilátek).** My sami jsme takto zachytili preklinickou fázi diabetes mellitus typu 1 u pacienta s totální alopecií a s JLT a předešli jsme tak možnému vývoji diabetické ketoacidózy. V tomto směru je třeba také myslet na možnost vývoje **život ohrožující adrenální insuficience při nepoznané autoimunitní adrenalitidě.**

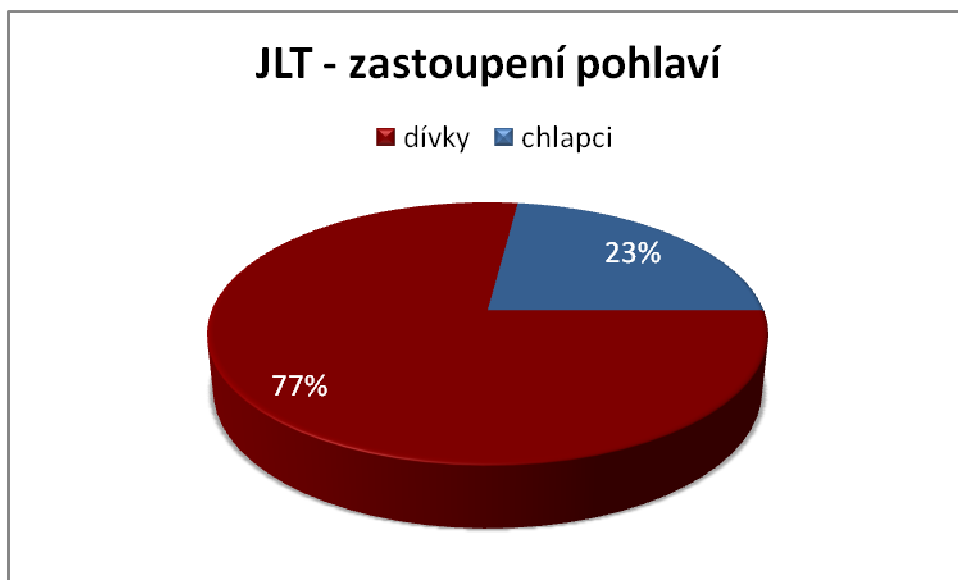
Na tomto místě je třeba připomenout **dispozici k JLT u některých genetických syndromů (Turnerův syndrom, Downův syndrom, Klinefelterův syndrom).** Děti s Turnerovým syndromem jsou indikovány k léčbě růstovým hormonem pro poruchu růstu, která tento syndrom provází. Nepoznaná primární hypotyreóza při JLT by u těchto dětí negativně ovlivnila růstovou prognózu i přes léčbu růstovým hormonem. V našem souboru 14 pacientek s Turnerovým syndromem je u 4 z nich (28,6%) přítomna JLT s hypofuncí štítné

žlázy, která je dobře kompenzována na léčbě. Prevalence JLT u pacientek s Turnerovým syndromem v našem souboru je ve shodě s udávanou prevalencí u těchto dětí 22-62% (45). Z opačného pohledu je důležité u dětí s JLT a současně malým věkem myslet na diagnózu Turnerova syndromu. Například mozaiková forma Turnerova syndromu by mohla fenotypicky uniknout diagnóze. Na našem pracovišti evidujeme pacientku od 13 let věku, která již několik let byla léčena pro JLT s hypofunkcí štítné žlázy a k diagnóze Turnerova syndromu vedla až opožděná puberta. Dívka rostla dlouho lineárně na 3. percentilu, ale zcela mimo své geneticky predikované pásmo dané výškami rodičů.

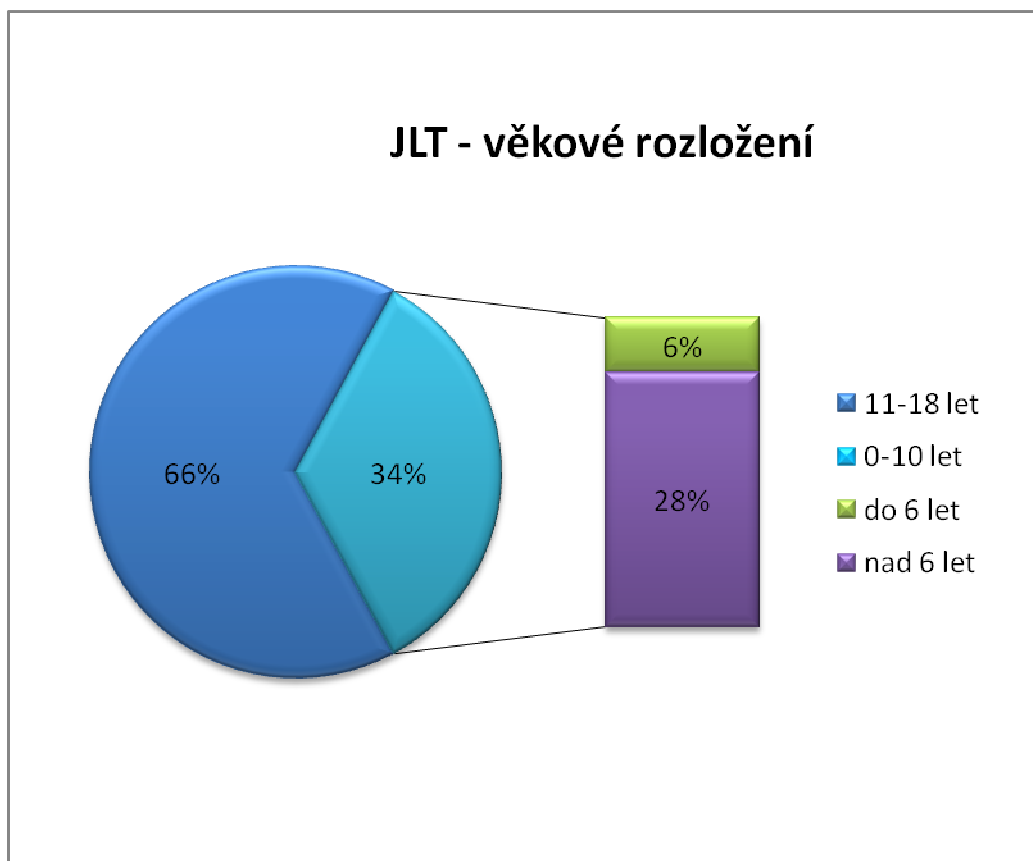
**Graf 2 Zastoupení thyreopatií v našem souboru 270 dětí**



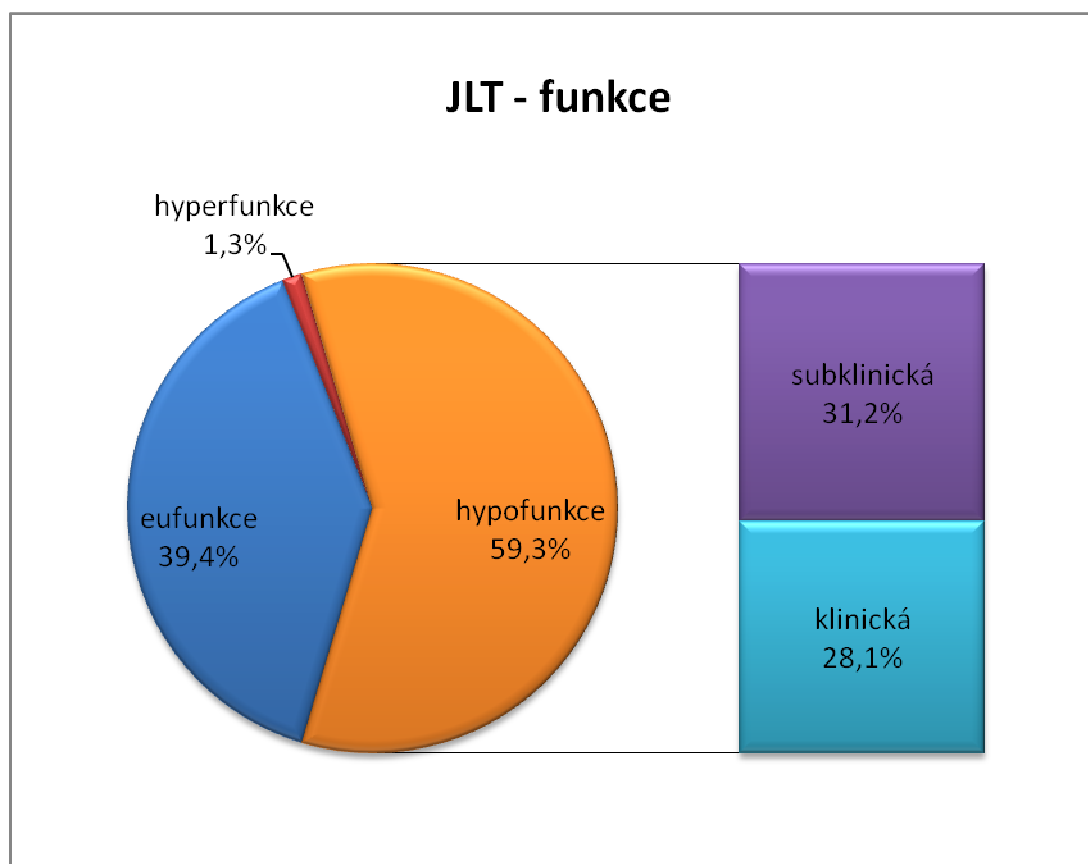
**Graf 3 Zastoupení pohlaví v souboru 231 dětí s JLT**



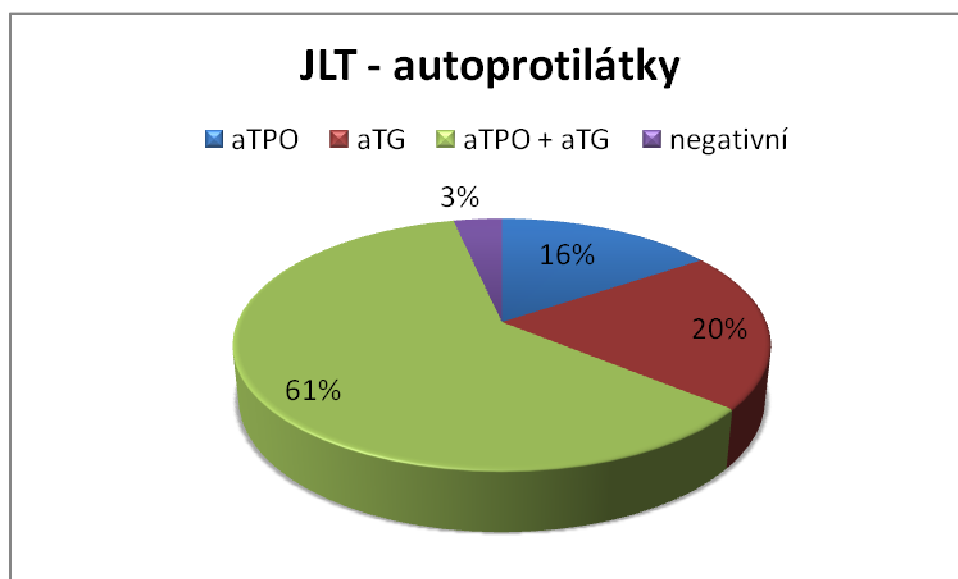
**Graf 4 Věkové rozložení souboru 231 dětí s JLT**



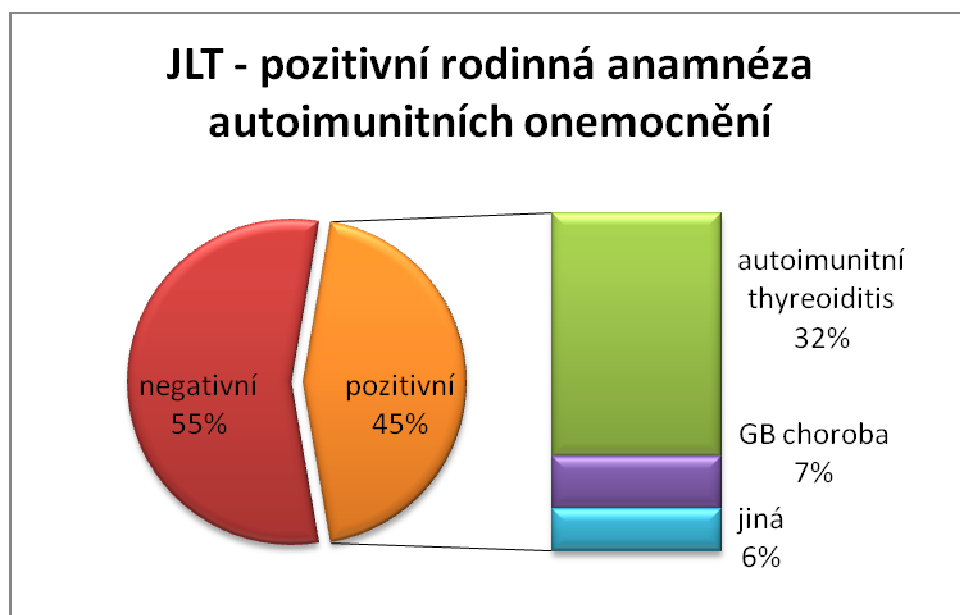
**Graf 5** Funkce štítné žlázy v době stanovení diagnózy JLT v souboru 231 dětí



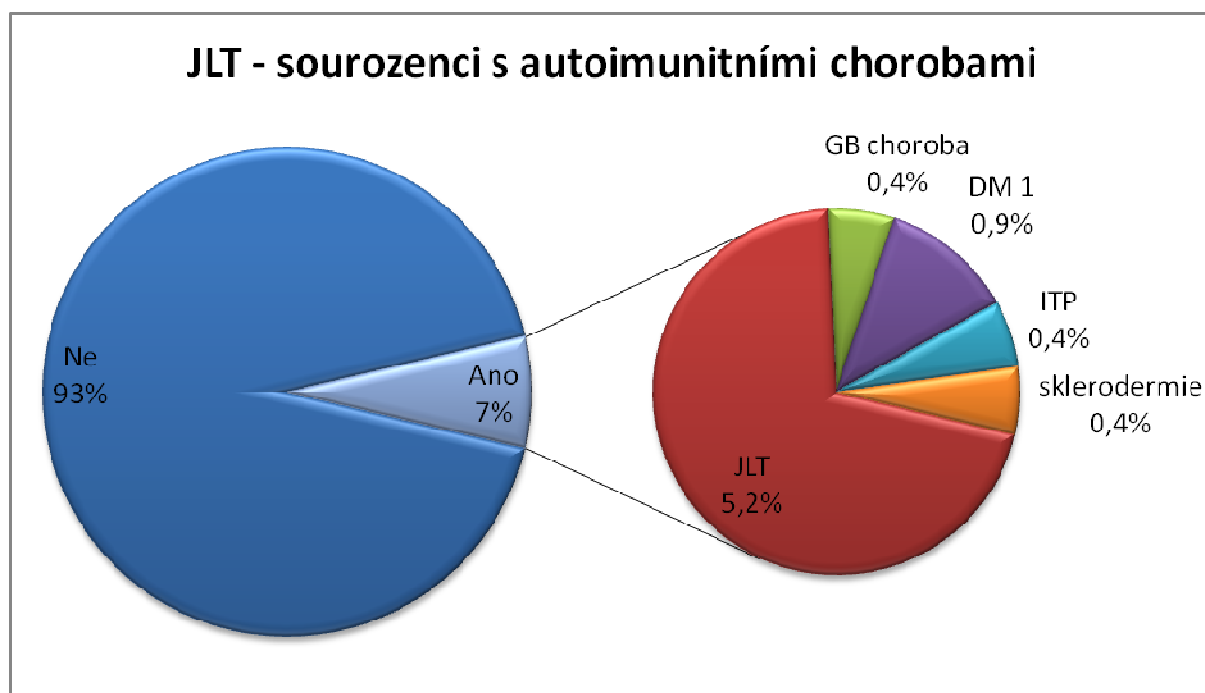
**Graf 6** Pozitivita autoprotilátek v době stanovení diagnózy v souboru 231 dětí s JLT



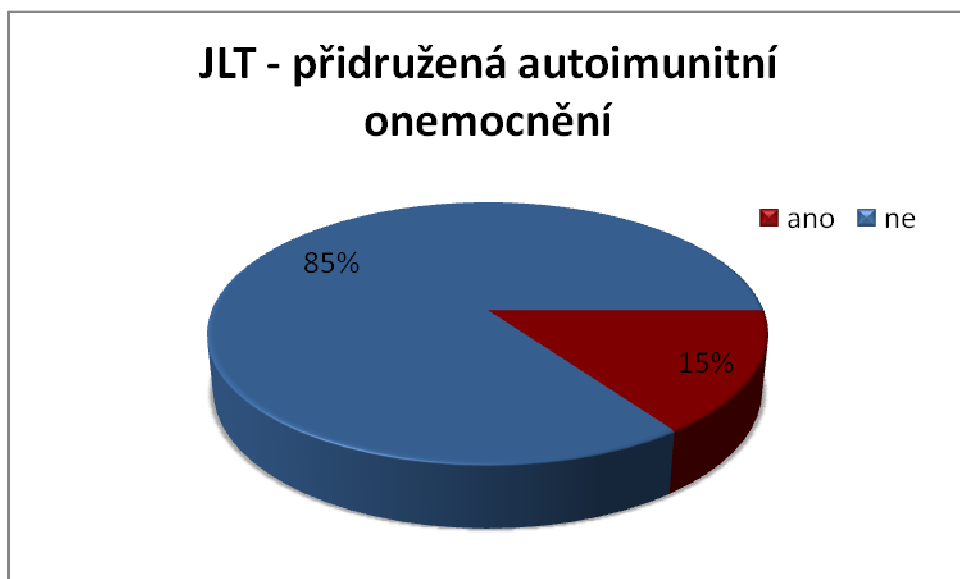
**Graf 7 Pozitivní rodinná anamnéza autoimunitních onemocnění v souboru 231 dětí s JLT**



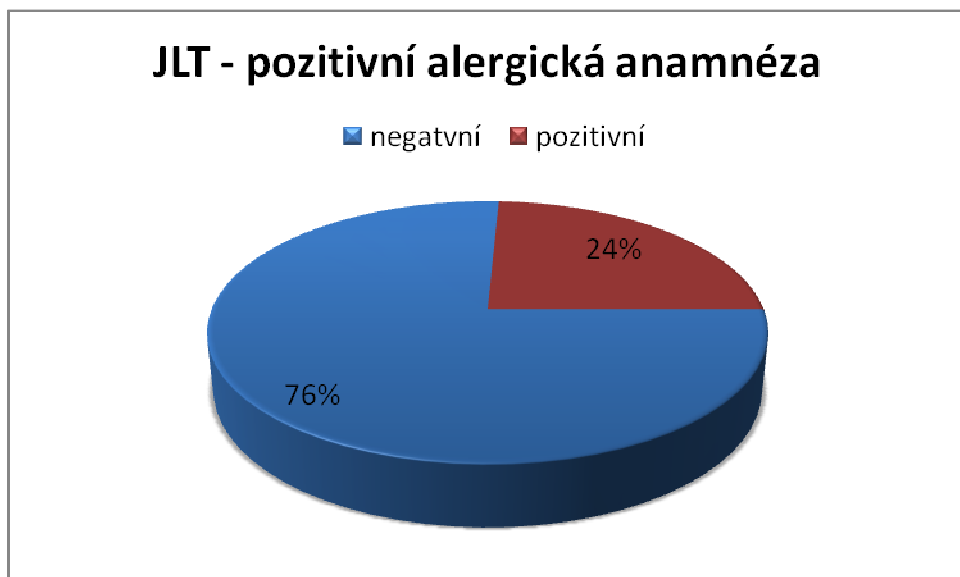
**Graf 8 Sourozenci s autoimunitními chorobami v souboru 231 pacientů s JLT**



**Graf 9** Přidružená autoimunitní onemocnění v souboru 231 pacientů s JLT, jejich přehled uvádí tabulka č. 2



**Graf 10** Pozitivní alergická anamnéza v souboru 231 pacientů s JLT



**Tabulka 2 Autoimunitní onemocnění u sourozenců pacientů s JLT**

<b>Autoimunitní onemocnění u sourozenců pacientů s JLT (7,4%)</b>	<b>Počet sourozenců</b>
Juvenilní lymfocytární thyreoiditis	12 (5,2%)
Diabetes mellitus typu 1	2 (0,9%)
Graves-Basedowova choroba	1 (0,4%)
Idiopatická trombocytopenická purpura	1 (0,4%)
Sklerodermie	1 (0,4%)

**Tabulka 3 Přidružená autoimunitní onemocnění u pacientů s JLT**

<b>Přidružené autoimunitní onemocnění (15,2%)</b>	<b>Počet pacientů s JLT</b>
Diabetes mellitus typu 1 (APS 2 – 1 pacient, APS 3 – 1 pacient)	19 (8,3%)
Celiakie	3 (1,3%)
Morbus Crohn	3 (1,3%)
Colitis ulcerosa	1 (0,4%)
Systémový lupus erythematodes	1 (0,4%)
Sjögrenův syndrom	1 (0,4%)
Juvenilní idiopatická artritida	1 (0,4%)
Vitiligo	1 (0,4%)
Sklerodermie	1 (0,4%)
Alopecie totální	2 (0,9%)
Idiopatická trombocytopenická purpura	1 (0,4%)
Autoimunitní hemolytická anémie	1 (0,4%)

### 5.3 Soubor, metodika, výsledky a závěr (Cíl 3.3 )

Posouzení imunologické reaktivity u pacientů s JLT *H. pylori* pozitivních a negativních a u zdravých kontrol *H. pylori* pozitivních a negativních stanovením množství a spektra produkováných cytokinů a chemokinů bazálně a po stimulaci krevních mononukleárních buněk lyzátem *H. pylori* a jeho antigeny metodou proteinové microarray. Výsledky byly publikovány v roce 2009 v časopise „Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes”.

#### 5.3.1 Soubor

##### Soubor – JLT

Vyšetřeno bylo celkem **53 pacientů s JLT**, a sice za bazálních podmínek, po stimulaci celým *H. pylori* a dále po stimulaci izolovaným lipopolysacharidem *H. pylori*. Tato skupina byla dále rozdělena na **skupinu *H.pylori* pozitivní (THP, n=20)** a **negativní (THN, n=33)**.

##### Soubor – kontrolní skupina

Zároveň byly stejným testům podrobeny PBMNc odebrané **kontrolní skupině zdravých dívek**, celkem se jednalo o **40 dívek**. Dívky byly opět rozděleny podle *H.pylori* pozitivity na pozitivní a negativní skupinu (**20 dívek bylo *H.pylori* pozitivních - CP, 20 dívek negativních – CN**). Kontrolní dívky byly ze stejné socioekonomické skupiny a jejich průměrný věk byl 15 let (rozmezí 7-26 let). Charakteristika pacientů s autoimunitní thyreoiditidou je uvedena v **Tabulce 4**.



**Tabulka 4** Charakteristika pacientů s autoimunitní thyreoiditidou

skupina	Pacienti s JLT H.pylori pozit.	Pacienti s JLT H.pylori neg.
Počet pacientů	10	23
Věk (roky) Medián/rozmezí	15/7-26	15/7-26
Forma thyreoiditidy Hypertrofická/atrofická	8/2	21/2
Manifestní gastrointestinální potíže	5/10	0
Hormonální substituce	10	23
Doba od diagnózy JLT do odběru vzorků Medián/rozmezí (měsíce)	5/0-24	6/0-18

### 5.3.2 Metodika

Krevní mononukleární buňky byly izolovány z heparinizované periferní žilní krve studovaných jedinců s JLT *H. pylori* pozitivních, negativních a zdravých kontrol metodou hustotní gradientové centrifugace na Ficollu. Imunologická reaktivita byla pak posuzována stanovením jejich bazální produkce cytokinů a chemokinů a po stimulaci lyzátem *H. pylori* a jeho LPS metodou proteinové microarray. Celkem bylo hodnoceno 23 cytokinů a chemokinů (viz 4.4. Metodika proteinové microarray, cytokiny a chemokiny)

### 5.3.3 Statistická analýza

Pro porovnání tří a více skupin byl použit Kruskal-Wallis test. Pro porovnání dvou skupin mezi sebou byl použit Mann-Whitney test. Wilcoxon Signed Ranks Test byl použit v každé skupině pro porovnání bazální a poststimulační odpovědi. Pro zjištění závislosti byl použit Spearmanův koeficient. Hladina významnosti  $p < 0.05$  byla považována za statisticky významnou.

### 5.3.4 Výsledky

#### **Výsledky bazální a poststimulační produkce cytokinů a chemokinů po stimulaci lyzátem**

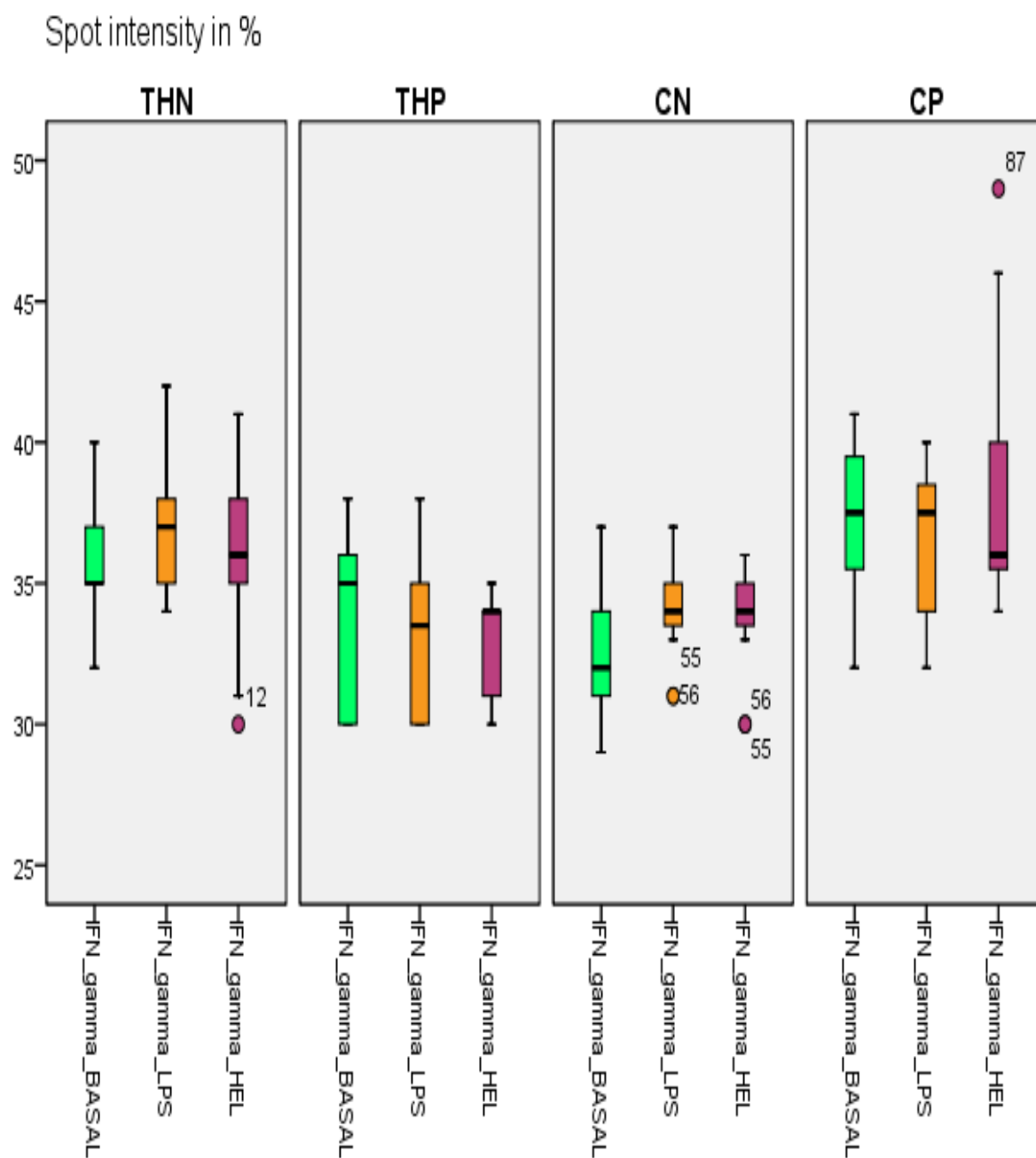
#### **H. pylori a jeho lipopolysacharidem**

##### 5.3.4.1

#### **Th1 cytokiny (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\beta$ )**

Statisticky významné zvýšení produkce IFN- $\gamma$  po specifické stimulaci bylo pozorováno u zdravých kontrol *H. pylori* negativních ve srovnání s jedinci s JLT *H.pylori* negativními (p=0.035 po stimulaci LPS, p=0.021 po stimulaci lyzátem *H. pylori*), stejně tak ve srovnání s jedinci s JLT *H.pylori* pozitivními (p=0.011 po stimulaci LPS, p=0.004 po stimulaci lyzátem *H. pylori*). **Graf č.11**

**Graf č. 11** Signifikantní zvýšení produkce IFN- $\gamma$  po stimulaci LPS a lyzátem *H.pylori* u skupiny negativních kontrol



**Legenda:**

- THN děti s autoimunitní thyreoiditou *H.pylori* negativní
- THP děti s autoimunitní thyreoiditou *H.pylori* pozitivní
- CN zdravé kontroly *H.pylori* negativní
- CP zdravé kontroly *H.pylori* pozitivní
- HEL *H. pylori*
- LPS *H. pylori* lipopolysacharid

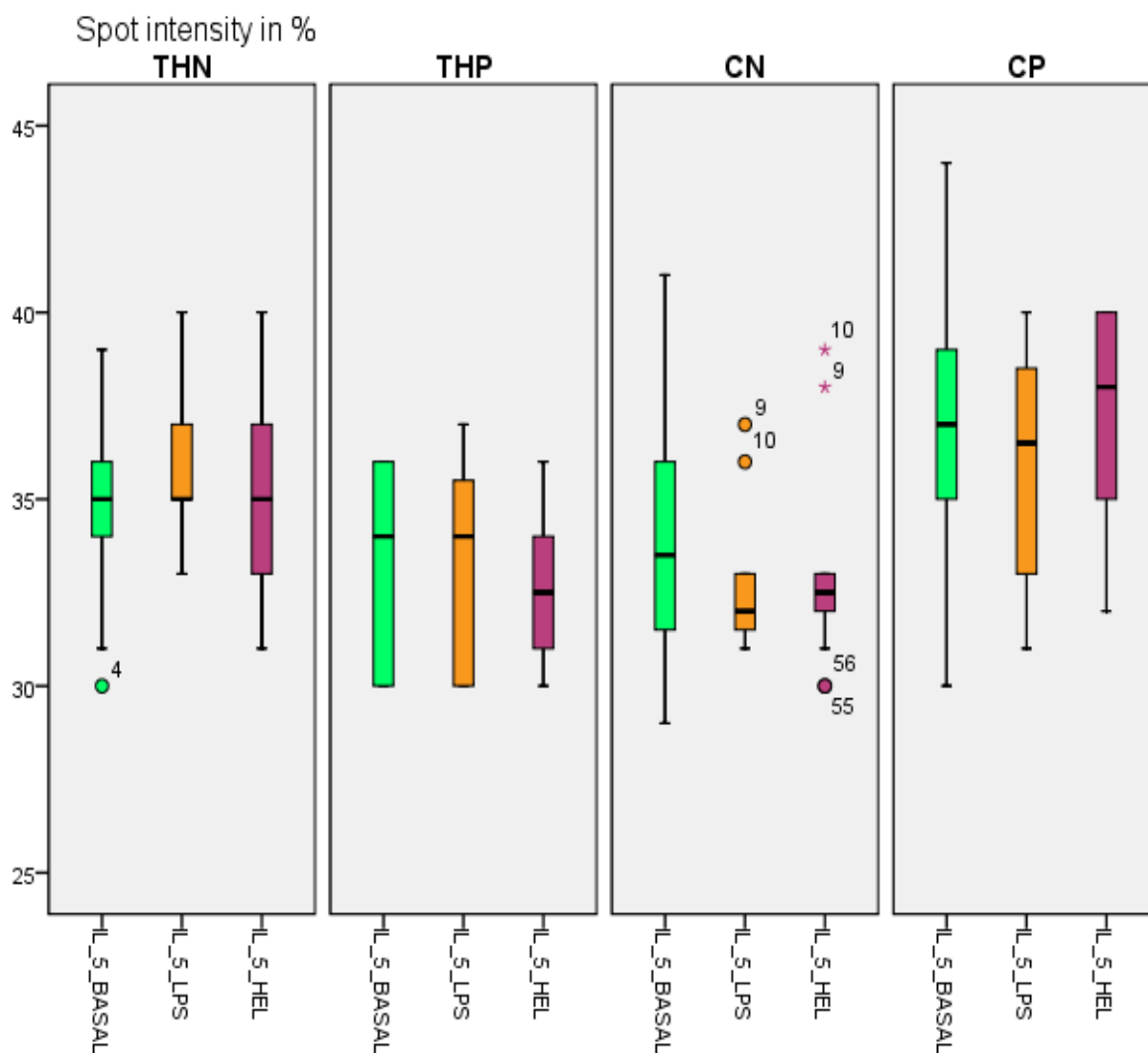
### 5.3.4.2

#### **Th2 cytokiny (IL-4, IL-5, IL-13)**

Zdravé kontroly *H. pylori* negativní reagovaly jako po stimulaci LPS, tak po stimulaci lyzátem *H. pylori* sníženou produkcí IL-5. Zdravé kontroly *H. pylori* negativní měly nižší rozdíl v produkci IL-5 (stimulovaná minus bazální produkce) po stimulaci LPS ve srovnání s jedinci JLT *H. pylori* negativními ( $p=0.013$ ), stejně tak s jedinci JLT *H. pylori* pozitivními ( $p=0.09$ ). Nepozorovali jsme statisticky významné rozdíly v produkci IL-4 mezi skupinami.

#### **Graf č. 12**

**Graf č. 12 Signifikantní snížení produkce IL-5 po stimulaci LPS a lyzátem *H.pylori* u skupiny negativních kontrol**



**Legenda:**

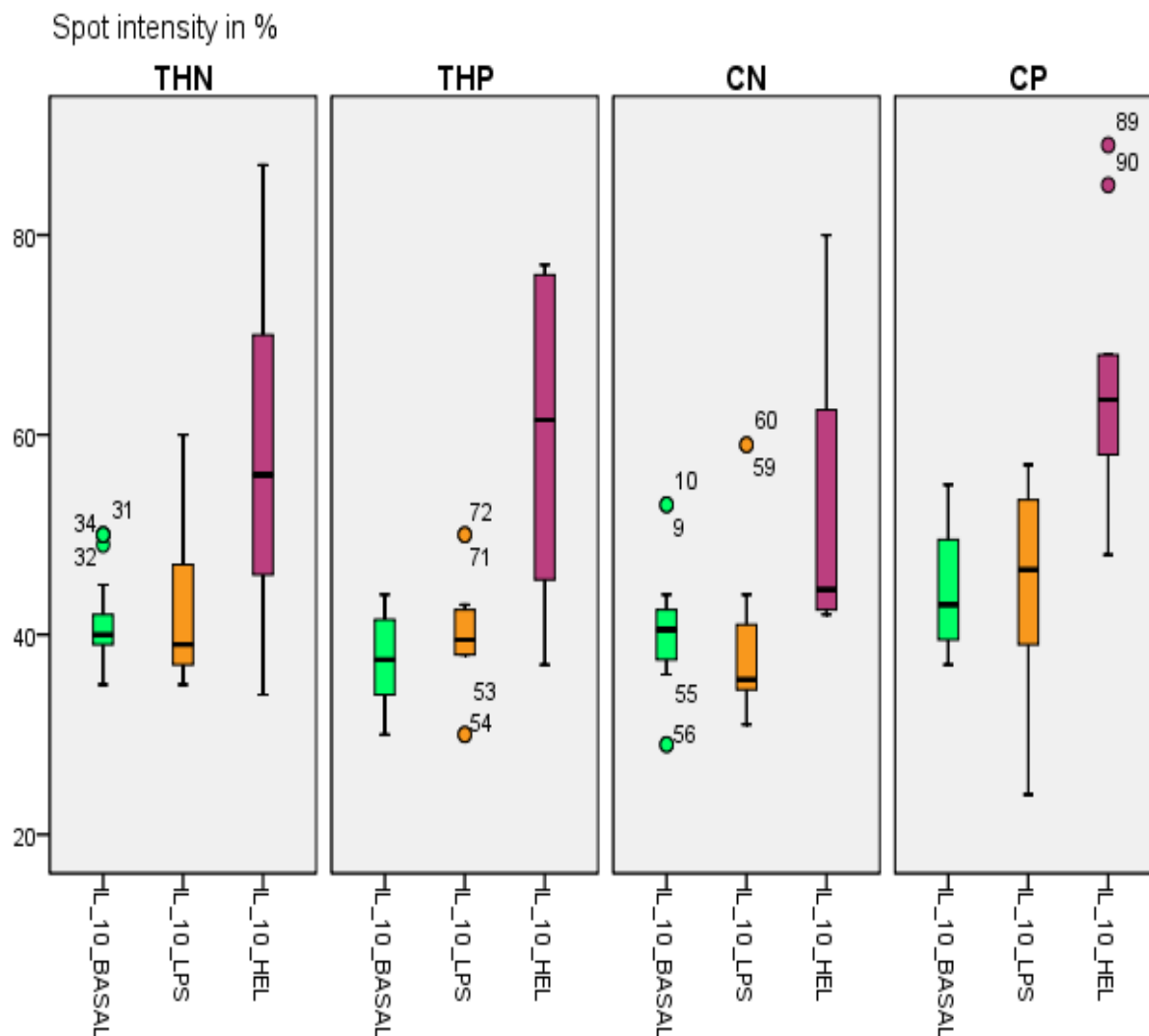
- THN děti s autoimunitní thyreoiditou *H.pylori* negativní
- THP děti s autoimunitní thyreoiditou *H.pylori* pozitivní
- CN zdravé kontroly *H.pylori* negativní
- CP zdravé kontroly *H.pylori* pozitivní
- HEL *H. pylori*
- LPS *H. pylori* lipopolysacharid

### 5.3.4.3

#### **Th3 cytokiny (IL-10, TGF- $\beta$ )**

Zdravé kontroly *H. pylori* negativní nereagovaly zvýšením produkce IL-10 po specifické stimulaci LPS ve srovnání s jedinci JLT *H. pylori* negativními ( $p=0.028$ ), stejně tak ve srovnání s jedinci JLT *H. pylori* pozitivními ( $p=0.026$ ). Opačná situace byla pozorována u TGF- $\beta$ . Zdravé kontroly *H. pylori* negativní měly vyšší produkci TGF- $\beta$  po stimulaci LPS ve srovnání se všemi ostatními skupinami ( $p=0.015$  jedinci JLT *H. pylori* negativní,  $p=0.015$  jedinci JLT *H. pylori* pozitivní,  $p=0.001$  zdravé kontroly *H. pylori* pozitivní). Jedinci JLT *H. pylori* negativní měli vyšší produkci TGF- $\beta$  po stimulaci LPS ve srovnání se zdravými kontrolami *H. pylori* pozitivními ( $p=0.01$ ), stejně tak ve srovnání s jedinci JLT *H. pylori* pozitivními ( $p=0.026$ ). **Graf. č. 13A, 13B**

**Graf 13A** Signifikantní snížení produkce IL-10 po stimulaci LPS u skupiny negativních kontrol

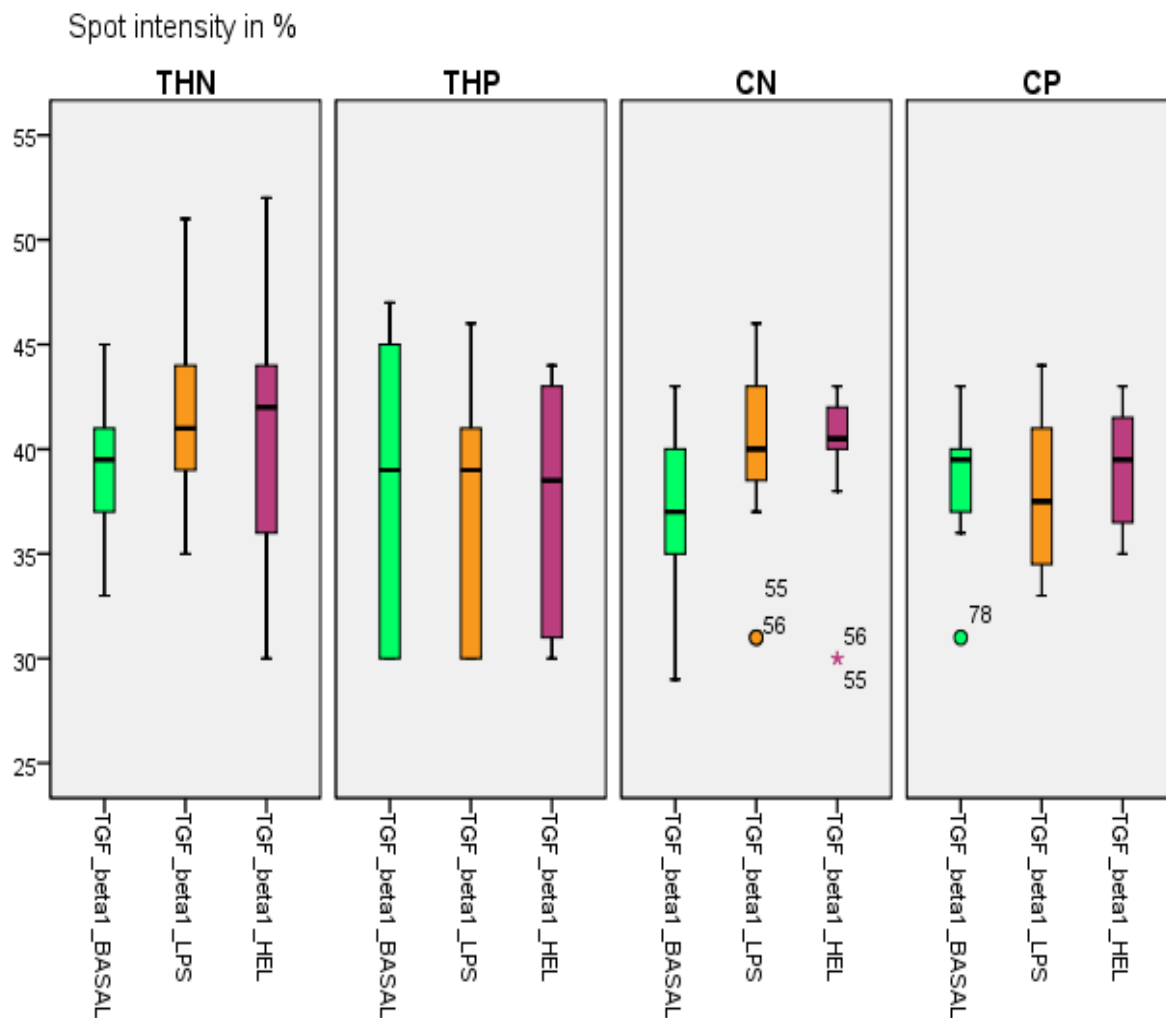


**Legenda:**

- THN děti s autoimunitní thyreoiditou *H.pylori* negativní
- THP děti s autoimunitní thyreoiditou *H.pylori* pozitivní
- CN zdravé kontroly *H.pylori* negativní
- CP zdravé kontroly *H.pylori* pozitivní
- HEL *H. pylori*
- LPS *H. pylori* lipopolysacharid



**Graf 13B** Signifikantní zvýšení TGF- $\beta$  1 produkce po LPS stimulaci u skupiny negativních kontrol a THN (pacienti JLT *H. pylori* negativní)



**Legenda:**

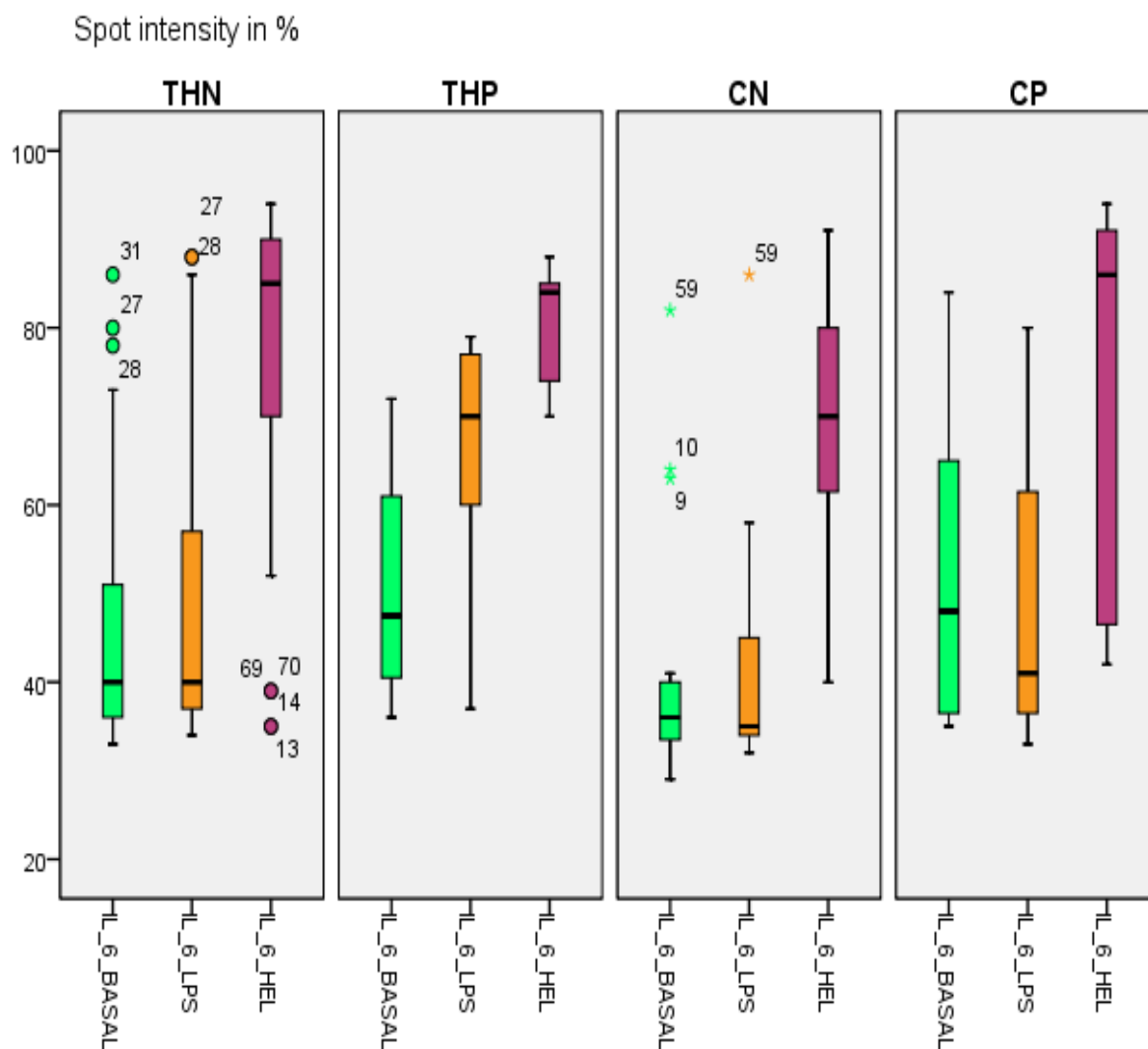
- THN děti s autoimunitní thyreoiditou *H.pylori* negativní
- THP děti s autoimunitní thyreoiditou *H.pylori* pozitivní
- CN zdravé kontroly *H.pylori* negativní
- CP zdravé kontroly *H.pylori* pozitivní
- HEL *H. pylori*
- LPS *H. pylori* lipopolysacharid

#### 5.3.4.4

##### Prozánětlivé cytokiny (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ )

Jedinci *H. pylori* pozitivní reagovali na stimulaci LPS zvýšením produkce IL-6 nejvíce ve srovnání se všemi ostatními skupinami ( $p=0.022$  jedinci JLT *H. pylori* negativní,  $p=0.001$  zdravé kontroly *H. pylori* negativní,  $p < 0.0001$  zdravé kontroly *H. pylori* pozitivní). Jedinci JLT *H. pylori* negativní měli nižší vzestup v produkci IL-6 po stimulaci LPS než jedinci *H. pylori* pozitivní, ale vyšší než zdravé kontroly *H. pylori* pozitivní ( $p=0.015$ ). **Graf č. 14** Jedinci JLT *H. pylori* negativní produkovali po stimulaci LPS vyšší množství TNF- $\alpha$  ve srovnání s jedinci JLT *H. pylori* pozitivními ( $p=0.042$ ), stejně tak ve srovnání se zdravými kontrolami *H. pylori* pozitivními ( $p=0.009$ ). Zdravé kontroly *H. pylori* pozitivní měly nižší produkci tohoto cytokinu po stimulaci LPS ve srovnání se zdravými kontrolami *H. pylori* negativními ( $p=0.007$ ).

**Graf č. 14** Zvýšení produkce IL-6 po stimulaci s LPS zejména u skupiny THP (pacienti s JLT *H.pylori* pozitivní)



**Legenda:**

- THN děti s autoimunitní thyreoiditou *H.pylori* negativní
- THP děti s autoimunitní thyreoiditou *H.pylori* pozitivní
- CN zdravé kontroly *H.pylori* negativní
- CP zdravé kontroly *H.pylori* pozitivní
- HEL *H. pylori*
- LPS *H. pylori* lipopolysacharid

### 5.3.4.5

#### **Chemokiny (GRO, GRO- $\alpha$ , IL-8, MCP-1,-2,-3, MIG, RANTES)**

##### **Chemokinová reakce po stimulaci lyzátem *H. pylori***

Jedinci JLT *H. pylori* negativní statisticky významně zvýšili produkci IL-8 po stimulaci lyzátem *H. pylori* ( $p < 0.0001$ ) ve srovnání s jedinci JLT *H. pylori* pozitivními. Jedinci JLT *H. pylori* negativní signifikantně zvýšili produkci GRO ve srovnání se zdravými kontrolami *H. pylori* negativními ( $p = 0.012$ ), IL-8 ( $p = 0.006$ ), MIG ( $p = 0.008$ ), RANTES ( $p = 0.001$ ) a ve srovnání se zdravými kontrolami *H. pylori* pozitivními snížili produkci MCP-1 ( $p = 0.042$ ). Zdravé kontroly *H. pylori* pozitivní měly ve srovnání s jedinci JLT *H. pylori* negativními po stimulaci lyzátem *H. pylori* vyšší produkci těchto chemokinů: GRO- $\alpha$  ( $p = 0.027$ ), MCP-2 ( $p = 0.001$ ), MCP-3 ( $p = 0.002$ ) a MIG ( $p = 0.026$ ). Jedinci JLT *H. pylori* pozitivní spíše snížili chemokinovou produkci. Toto bylo signifikantní pro GRO- $\alpha$  ( $p = 0.006$ ), IL-8 ( $p < 0.0001$ ), MCP-1 ( $p = 0.012$ ), MCP-2 ( $p = 0.001$ ) a MIG ( $p = 0.033$ ) ve srovnání se zdravými kontrolami *H. pylori* pozitivními. Skupina zdravých kontrol *H. pylori* pozitivní měla také vyšší chemokinovou produkci ve srovnání se zdravými kontrolami *H. pylori* negativními [signifikantní pro GRO ( $p = 0.008$ ), GRO- $\alpha$  ( $p = 0.004$ ), IL-8 ( $p = 0.002$ ), MCP-1 ( $p = 0.007$ ), MCP-2 ( $p = 0.02$ ), MCP-3 ( $p = 0.047$ ) MIG ( $p = 0.004$ )].

##### **Chemokinová reakce po stimulaci LPS**

Jedinci JLT *H. pylori* negativní produkovali nižší množství MCP-2 ve srovnání s jedinci JLT *H. pylori* pozitivními ( $p < 0.0001$ ), ale vyšší množství GRO ( $p = 0.004$ ), MCP-1 ( $p = 0.046$ ), MCP-3 ( $p = 0.025$ ), MIG ( $p = 0.019$ ) a RANTES ve srovnání se zdravými kontrolami

*H. pylori* negativními. Jedinci JLT *H. pylori* pozitivní produkovali vyšší množství GRO (p=0.005), MCP-1 (p=0.042), MCP-2 (p=0.041), MCP-3 (p=0.029), MIG (p=0.017) a RANTES ve srovnání se zdravými kontrolami *H. pylori* negativními a nižší množství IL-8 ve srovnání se zdravými kontrolami *H. pylori* pozitivními (p=0.033). Zdravé kontroly *H. pylori* pozitivní měly také vyšší chemokinovou produkci po stimulaci LPS ve srovnání se zdravými kontrolami *H. pylori* negativními [signifikantní pro GRO (p=0.018), IL-8 (p=0.003), MCP-1 (p=0.042) a RANTES (p=0.017)].

#### 5.3.4.6

#### **Růstové faktory a další cytokiny (G-CSF, GM-CSF, IL-3,-7,-15)**

##### **Reakce po stimulaci lyzátem *H. pylori***

Jedinci JLT *H. pylori* negativní produkovali více G-CSF (p=0.005) a IL-7 (p=0.001) ve srovnání se zdravými kontrolami *H. pylori* negativními. Jedinci JLT *H. pylori* pozitivní spíše zvýšili signifikantně produkci G-CSF (p=0.003), GM-CSF (p=0.033) a IL-7 (p=0.023) ve srovnání se zdravými kontrolami *H. pylori* negativními.

##### **Reakce po stimulaci LPS**

LPS stimuloval produkci G-CSF (p<0.0001), GM-CSF (p=0.007) a IL-7 (p=0.005) u jedinců JLT *H. pylori* negativních (signifikantně ve srovnání se zdravými kontrolami *H. pylori* negativními) a IL-15 (p=0.022), tento signifikantní rozdíl byl také pozorován při srovnání jedinců JLT *H. pylori* negativních a zdravých kontrol *H. pylori* pozitivních. Zdravé

kontroly *H. pylori* negativní signifikantně snížily produkci G-CSF ( $p < 0.0001$ ), GM-CSF ( $p = 0.005$ ) a IL-7 ( $p = 0.003$ ) ve srovnání s jedinci JLT *H. pylori* pozitivními, kteří měli vyšší produkci těchto chemokinů.

## Vliv dalších faktorů na výsledky proteinové microarray

S výsledky proteinové microarray byl korelován věk pacientů, hormonální funkce a autoprotilátky proti štítné žláze. Starší pacienti ze skupiny JLT *H. pylori* pozitivní vykazovali vyšší reaktivitu proti lyzátu *H. pylori* než mladší jedinci (především u produkce GM-CSF,  $r=0.975$ ,  $p=0.005$ ) a naopak starší jedinci méně reagovali na stimulaci LPS (především v produkci IL-7,  $r=-1$ ). Ve skupině JLT *H. pylori* negativní se reaktivita vůči *H. pylori* a vůči LPS snižovala se stoupajícím věkem (detekováno u MCP-2,3, MIG a IL-2 produkce:  $r=-0.630$ ,  $p=0.038$ ,  $r=-0.676$ ,  $p=0.022$ ,  $r=-0.604$ ,  $p=0.049$  a  $r=-0.771$ ,  $p=0.005$ ).

Nižší titr protilátek proti thyreoidální peroxidáze byl spojen s nižší bazální hladinou IL-6, IL-10 a IL-15 ( $r=-0.691$ ,  $p=0.019$ ,  $r=-0.782$ ,  $p=0.004$ ,  $r=-0.645$ ,  $p=0.032$ ). Ostatní antithyreoidální autoprotilátky, stejně tak hladina TSH a hladiny dalších hormonů štítné žlázy nevykazovaly vliv na výsledky studie.

### 5.3.5 Závěr

Imunologická reaktivita k lyzátu *H. pylori* a LPS se lišila mezi studovanými skupinami. Jedinci JLT *H. pylori* pozitivní i zdravé kontroly *H. pylori* pozitivní vykazovali masivní chemokinovou odpověď na stimulaci krevních mononukleárních buněk lyzátem *H. pylori* i jeho lipopolysacharidem. Děti s JLT *H.pylori* pozitivní produkují po stimulaci prozánětlivé cytokiny, zejména IL-6.

Zdravé kontroly *H.pylori* negativní měly nejnižší bazální cytokinovou a chemokinovou produkci proti ostatním skupinám, ale po stimulaci *H.pylori* ve srovnání s jedinci JLT *H. pylori* pozitivními i negativními signifikantně stoupala produkce IFN- $\gamma$  (Th1 cytokin) a také regulačního cytokinu TGF- $\beta$  (Th3 cytokin). Jedinci JLT *H. pylori* negativní měli vyšší produkci TGF- $\beta$  po stimulaci LPS ve srovnání se zdravými kontrolami *H. pylori* pozitivními, stejně tak ve srovnání s jedinci JLT *H. pylori* pozitivními. IL-10 jako další regulační cytokin byl u skupiny zdravých kontrol *H. pylori* negativních spíše snížen, stejně jako produkce IL-5.

U pacientů JLT *H. pylori* pozitivních a *H. pylori* pozitivních zdravých kontrol byla tedy zjištěna nižší produkce regulačních cytokinů, což lze vysvětlit buď vyčerpáním jejich imunokompetentních buněk nebo negativním vlivem infekce *H. pylori*.

**Uvedené testy potvrdily významný vliv infekce *H. pylori* na imunokompetentní buňky, a to zejména v případě jedinců s autoimunitní dispozicí a tudíž přítomnou imunologickou dysbalancí.**



### 5.3.6 Diskuse

*H.pylori* je mikrob kolonizující lidský žaludek a vyvolávající zánět žaludeční sliznice. Je adaptován na přežívání v kyselém žaludečním prostředí produkcí ureázy (38). Mikrob je neinvazivní, kolonizuje žaludeční sliznici, zůstává v povrchovém hlenu a neproniká do hlubších vrstev sliznice. Prostřednictvím adhezinu se váže na epitelální buňky žaludeční sliznice a produkcí řady proteinů vyvolává mohutnou systémovou a lokální slizniční zánětlivou odpověď, která zahrnuje reakci neutrofilů, T, B lymfocytů, plazmatických buněk, makrofágů, žírných buněk, může docházet k apoptóze epitelálních buněk žaludeční sliznice (38). V žaludeční sliznici byla zjištěna převaha Th1 lymfocytů s produkcí Th1 cytokinů podporující gastritidu. Zánětlivá reakce nevede k eradikaci infekce, ale může vést k tkáňovému poškození. U části pacientů dochází k tvorbě protilátek proti H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPáze žaludečních parietálních buněk s rozvojem atrofické gastritidy. Dalším faktorem poškození epitelálních buněk žaludeční sliznice jsou volné kyslíkové nebo dusíkaté radikály vytvářené aktivovanými neutrofilů (38). Systémová imunitní odpověď hostitele zahrnuje produkci řady chemokinů, cytokinů a stimulaci exprese adhezivních molekul, což by mohlo přispět k rozvoji onemocnění s extragastrointestinální lokalizací (12). Ze zvířecích modelů je známo, že akutní infekce *H. pylori* je charakteristická spíše Th1 odpovědí (26), zatímco T lymfocyty v žaludeční sliznici v průběhu chronické infekce produkují jak Th1, tak Th2 cytokiny (10).

Možná role infekce *H. pylori* v iniciaci autoimunity zůstává nejednoznačná a není dosud vyřešena. Nejsou jednotné názory na vztah autoimunitní tyreoiditidy a současné infekce *H. pylori*. Někteří jsou pro příčinnou souvislost mezi infekcí *H. pylori* a autoimunitní tyreoiditidou (11,15,21), někteří jsou proti (27,41). Manifestace onemocnění závisí na faktorech virulence *H. pylori* (VacA cytotoxin, CagA protein, ureáza) a genetické predispozici hostitele. Pacienti s *H. pylori* pozitivní gastritidou produkují široké spektrum

antigastrických protilátek zaměřených proti různým antigenům (1,12,18,43). Mezi těmito antigeny hrají významnou roli Lewis antigeny druhé třídy tj. Lewis x a Lewis y (Le x, y), které jsou exprimovány na beta řetězci žaludeční protonové pumpy a dále na žaludečním mucinu. Obdobné antigeny exprimuje *H. pylori* na svém povrchu jako součást lipopolysacharidu. *H. pylori* stimuluje tvorbu autoprotilátek zaměřených proti Lewis antigenům, které jsou však zároveň exprimovány žaludeční sliznicí. Mechanismus molekulárních mimiker je tedy zavzat do patogeneze gastritidy, a to zvláště atrofické. Lewis antigeny x a y jsou také součástí krevní skupiny Lewis. Tyto antigeny jsou exprimovány na povrchu erytrocytů, dále na krevních a synoviálních granulocytech, jak již zmíněno v trávicím traktu na žaludeční sliznici, ale i v kolon, v epiteliálních buňkách štítné žlázy a pankreatu (23,30,31).

Cílem studie bylo zjistit imunoreaktivitu periferních krevních mononukleárních buněk pacientů s JLT a zdravých jedinců k lyzátu *H. pylori* a k jeho lipopolysacharidu. Antigeny pro stimulaci byly připraveny z 8 náhodně vybraných kmenů izolovaných od pacientů z oblasti Plzeňského kraje.

Produkce cytokinů mezi jedinci v populaci je geneticky odlišná. Th1 mediovaná autoimunitní odpověď s destrukcí thyreocytů je typická pro hypotyreózu u Hashimotovy thyreoiditidy, Th2 mediovaná humorální odpověď s tvorbou stimulujících autoprotilátek proti TSH receptorům vede ke Graves-Basedowově chorobě (19).

Imunoreaktivita a cytokinový profil je ovlivněn mnoha faktory. Ve studii byl zjištěn vliv věku na naše výsledky, a to na intenzitu cytokinové produkce hlavně u dětí s JLT *H. pylori* pozitivních po stimulaci jejich periferních krevních mononukleárních buněk lyzátem *H. pylori* a jeho lipopolysacharidem. Starší jedinci ve skupině dětí JLT *H. pylori* negativní měli spíše nižší produkci určitých chemokinů (MCP-2,-3, MIG) a IL-2. Toto není překvapující, protože stárnutí je komplexní proces, který ovlivňuje vývoj imunitního systému a jeho

schopnost funce (17). Nebyli jsme schopni analyzovat vliv pohlaví na výsledky, protože do studie bylo zařazeno pouze ženské pohlaví. Toto vyplývá z vyšší frekvence výskytu autoimunitní thyreoiditidy u ženského pohlaví (22,42), takže jsme nebyli schopni získat reprezentativní mužskou kohortu s JLT. Nejistili jsme korelaci mezi produkcí chemokinů a cytokinů a mezi hladinami protilátek proti thyreoglobulinu a hladinami thyreoidálních hormonů jak u skupiny pacientů s JLT *H. pylori* negativní, tak u skupiny pacientů s JLT *H. pylori* pozitivní. Nižší titry protilátek proti thyreoidální peroxidáze byly spojeny s nižšími bazálními hladinami IL-6,-10 a IL-15, ale toto pozorování nemůže být vysvětleno odlišným trváním nemoci nebo terapií, protože testovaní pacienti se v těchto aspektech neodlišovali. Pro malý počet pacientů s atrofickou formou JLT jsme nemohli porovnat odlišné formy thyreoiditidy.

*H. pylori* pozitivní skupiny (JLT *H. pylori* pozitivní pacienti a zdravé kontroly *H. pylori* pozitivní) vykazovaly masivní chemokinovou odpověď na stimulaci *H. pylori* a jeho lipopolysacharidem a pacienti JLT *H. pylori* pozitivní produkovali po stimulaci vyšší množství prozánětlivých cytokinů- hlavně IL-6. Zdravé kontroly *H. pylori* negativní vykazovaly nižší bazální cytokinovou a chemokinovou produkci, ale na specifickou stimulaci reagovaly zvýšenou produkcí IFN- $\gamma$  (Th1 cytokin) a zvýšenou produkcí regulačního cytokinu TGF- $\beta$ . Naproti tomu produkce dalšího regulačního cytokinu IL-10 byla spíše u této skupiny snižena, stejně tak produkce IL-5 ze skupiny TH2 cytokinů.

Jak již bylo v úvodu popsáno – imunitní odpověď může být polarizována různým směrem. Předkládaná práce, dle mého názoru, představuje přínos také v tom, že ukazuje na důležitost vztahu polarizace imunitní odpovědi ve vztahu k důsledkům infekce. Tato polarizace imunitní odpovědi rozhoduje o tom, zda infekce bude účinně eradikována, zda bude přetrvávat v chronické podobě nebo zda konsekvencí imunitní reakce vůči infekčnímu agens se rozvine imunopatologická choroba. Zde je důležité upozornit na nedávno popsané

tzv. pathogen associated molecular patterns (PAMPs) mezi které patří například bakteriální lipopolysacharid. PAMPy se váží na speciální receptory, mezi které patří například tzv. Toll like receptory. Tyto receptory se vyskytují též na antigen prezentujících buňkách a rezultující signalizace potom orientuje antigen prezentující buňku, aby pomáhala směřovat imunitní reakci ideálně žádoucím směrem (46).

Poslední vědecké výsledky ukazují, že u autoimunitních chorob nelze opomíjet ani nespecifickou imunitu a imunitní prvky stojící na pomezí specifické a nespecifické imunity jako jsou právě antigen prezentující buňky. Právě například reakce na bakteriální lipopolysacharid a následné „ne zcela vhodné“ nasměrování imunitní odpovědi by mohlo též vysvětlovat pozorované změny a přinášet vysvětlení spojení infekce *H. pylori* a studované autoimunitní choroby. Jedná se ovšem o otázku dalšího výzkumu, která je nyní nad rámec předkládané práce a je zde uváděna pro komplexnost diskuse a rovněž jako nastínění dalších směrů výzkumu.

Výsledky proteinové microarray (mediánové hodnoty intensity testu v %)

Person	THN	THP	CN	CP	Person	THN	THP	CN	CP	Person	THN	THP	CN	CP
<b>Th1 cytokines</b>														
IL_2_BASAL	35,00	34,00	32,00	35,00	IL_2_LPS	35,00	34,00	33,00	37,00	IL_2_HEL	35,00	34,00	33,00	36,00
IFN_gamma_BASAL	35,00	35,00	32,00	36,50	IFN_gamma_LPS	37,00	33,50	34,00	37,50	IFN_gamma_HEL	36,00	34,00	34,00	36,00
TNF_beta_BASAL	38,00	36,50	36,00	39,50	TNF_beta_LPS	38,50	36,50	37,50	39,00	TNF_beta_HEL	38,00	35,00	36,00	40,50
<b>Th2 cytokines</b>														
IL_5_BASAL	35,00	34,00	33,50	36,50	IL_5_LPS	35,00	34,00	32,00	36,50	IL_5_HEL	35,00	32,50	32,50	38,00
IL_13_BASAL	35,50	34,50	32,00	34,50	IL_13_LPS	37,00	35,00	34,50	34,00	IL_13_HEL	37,00	37,00	34,00	36,00
<b>Th3 cytokines</b>														
IL_10_BASAL	40,00	37,50	40,50	42,00	IL_10_LPS	39,00	39,50	35,50	46,50	IL_10_HEL	56,00	61,50	44,50	63,50
TGF_beta1_BASAL	39,50	39,00	37,00	40,00	TGF_beta1_LPS	41,00	39,00	40,00	37,50	TGF_beta1_HEL	42,00	38,50	40,50	39,50
<b>Inflammatory cytokines</b>														
IL_1alfa_BASAL	35,00	35,00	34,00	36,00	IL_1alfa_LPS	38,00	35,00	35,50	37,50	IL_1alfa_HEL	38,50	35,50	35,00	38,00
IL_6_BASAL	40,00	47,50	36,00	42,00	IL_6_LPS	40,00	70,00	35,00	41,00	IL_6_HEL	85,00	84,00	70,00	86,00
TNF_alfa_BASAL	39,00	36,50	37,00	40,00	TNF_alfa_LPS	39,50	38,00	40,00	38,00	TNF_alfa_HEL	40,00	38,00	39,00	42,00

Výsledky proteinové microarray (mediánové hodnoty intensity testu v %),

Person	THN	THP	CN	CP	Person	THN	THP	CN	CP	Person	THN	THP	CN	CP
<b>Chemokines</b>														
GRO_BASAL	80,50	77,50	88,00	90,00	GRO_LPS	86,00	81,50	82,00	92,00	GRO_HEL	90,00	80,50	85,00	93,00
GRO_alfa_BASAL	43,00	40,00	41,00	46,00	GRO_alfa_LPS	44,00	46,00	37,00	46,00	GRO_alfa_HEL	76,50	60,50	62,50	86,50
IL_8_BASAL	83,00	76,50	76,00	83,50	IL_8_LPS	83,00	77,50	72,00	86,50	IL_8_HEL	87,50	68,00	72,50	89,50
MCP_1_BASAL	70,00	50,50	54,00	50,50	MCP_1_LPS	65,00	53,50	49,50	56,00	MCP_1_HEL	62,00	52,00	51,00	56,00
MCP_2_BASAL	37,00	34,50	39,00	42,50	MCP_2_LPS	37,00	39,00	41,00	41,50	MCP_2_HEL	44,00	34,00	49,50	72,50
MCP_3_BASAL	35,00	33,00	32,50	35,00	MCP_3_LPS	35,00	34,50	30,50	34,50	MCP_3_HEL	36,50	34,00	33,50	39,00
MIG_BASAL	36,50	33,00	35,00	36,00	MIG_LPS	35,00	33,00	32,50	36,00	MIG_HEL	36,50	32,00	32,00	39,00
RANTES_BASAL	57,50	57,50	60,00	60,50	RANTES_LPS	61,00	62,50	57,00	65,50	RANTES_HEL	65,50	67,50	58,00	66,50
<b>Growth factors and „other“ cytokines</b>														
GCSF_BASAL	35,00	32,50	35,00	35,50	GCSF_LPS	35,00	34,00	33,00	33,00	GCSF_HEL	35,00	34,00	33,00	37,50
GM-CSF_BASAL	36,50	33,50	37,00	35,00	GM-CSF_LPS	37,00	36,00	33,00	36,50	GM-CSF_HEL	42,00	40,00	38,00	39,00
IL_3_BASAL	37,00	35,50	34,00	36,50	IL_3_LPS	38,00	36,00	35,00	39,00	IL_3_HEL	37,00	36,50	35,00	40,00
IL_7_BASAL	35,00	33,00	33,50	34,00	IL_7_LPS	35,00	34,00	31,00	35,00	IL_7_HEL	36,00	33,50	31,00	36,00
IL_15_BASAL	35,00	35,00	32,00	36,00	IL_15_LPS	37,50	34,00	33,00	37,00	IL_15_HEL	36,00	32,50	35,00	37,00

## 6. Závěry

### 3.1

Porovnali jsme výskyt infekce *H. pylori* u dětí s JLT a u zdravých asymptomatických dětí. Ze 199 dětí s JLT byla u 15 nemocných potvrzena aktivní infekce *H. pylori*, tj. šlo o 7,5 % infikovaných dětí. Jednalo se o 14 dívek a 1 chlapce s průměrným věkem  $11,2 \pm 2,3$  let. Aktivní infekce *H. pylori* byla stanovena neinvazivním diagnostickým testem přítomnosti antigenu *H. pylori* ve stolici pomocí monoklonálních protilátek. U 6 dětí byla přítomna hypofunkce štítné žlázy. Z těchto dětí u 3 byla přítomna atrofická forma thyreoiditidy s těžkou hypotyreózou, ostatní děti měly hypertrofickou formu thyreoiditidy. 7 dětí podstoupilo gastroscopické vyšetření, které potvrdilo chronickou aktivní gastritidu. Pouze 3 děti měly gastrointestinální potíže při *H. pylori* infekci, ostatní děti byly asymptomatické. Toto zjištění je v souladu s obecnými poznatky o asymptomatické infekci *H. pylori* u dětí až v 90 % případů.

Prevalence infekce *H. pylori* u zdravých českých dětí byla prokázána u 110 z 1545 dětí, tj. u 7,1 %. Byla zjištěna pozitivní asociace s věkem, ale bez závislosti na pohlaví a výskyt infekce byl častější u dětí žijících v nepříznivých socioekonomických podmínkách.

Celková prevalence infekce *H.pylori* u zdravých českých dětí je 7,1 % a ukazuje na to, že výskyt infekce *H.pylori* u asymptomatické dětské populace je srovnatelný s výskytem infekce *H. pylori* u pacientů s JLT (7,5%). Vzhledem k věkově specifické závislosti prevalence infekce *H. pylori* v dětském věku bylo současně provedeno srovnání s věkově odpovídající kontrolní skupinou (10-13 roků), kde prevalence infekce *H.pylori* dosáhla 8,2 % a nebyla tedy také signifikantně odlišná od prevalence infekce *H.pylori* v JLT skupině dětí.

## 3.2

Provedli jsme rozbor souboru našich pacientů s JLT z hlediska zastoupení pohlaví, věku, funkce štítné žlázy a přítomnosti autoprotilátek proti štítné žláze v době stanovení diagnózy JLT, přidružených autoimunitních chorob, výskytu autoimunitních chorob v rodině pacientů a počtu sourozenců s autoimunitní chorobou v souboru.

Ve shodě s literárními údaji v našem souboru 231 dětí s JLT převažovalo postižení ženského pohlaví (77%). Zvýšený výskyt autoimunitních onemocnění u ženského pohlaví doložil také rozbor rodinné anamnézy v našem souboru, kdy pouze v 1,3 % případů byl autoimunitním onemocněním postižen rodič nebo prarodič mužského pohlaví.

Věkové rozložení našeho souboru dokládá nejčastější vývoj autoimunitních onemocnění v období puberty a adolescence (věk 11-18 let v době stanovení diagnózy JLT zastoupen v souboru v 66%). Upozornili jsme ale na vývoj JLT již u velmi malých předškolních dětí.

V 60,6 % byla přítomna v době stanovení diagnózy JLT pozitivita obou specifických autoprotilátek antiTPO a antiTG. 3,5 % pacientů s diagnózou JLT měli negativní autoprotilátky proti štítné žláze. Negativita autoprotilátek proti štítné žláze tedy diagnózu JLT nevyklučuje.

Na podkladě našich klinických zkušeností jsme zdůraznili význam vyšetřování přítomnosti blokuujících antiTSH protilátek u pacientek s autoimunitní thyreoiditidou (především s atrofickou formou) v graviditě. Pozitivita těchto protilátek predikuje možnost zablokování štítné žlázy u plodu s vývojem přechodné formy kongenitální hypotyreózy, kterou můžeme potvrdit vyšetřením TSH z pupečnickové krve a časněji nasadit substituční terapii levothyroxinem ještě před znalostí screeningu kongenitální hypotyreózy.



24 % našich pacientů mělo pozitivní alergickou anamnézu potvrzující genetickou dispozici k imunopatologickým reakcím u těchto jedinců. U dětí s pozitivní alergickou anamnézou je třeba myslet na zvýšené riziko vývoje autoimunitních onemocnění.

Zjistili jsme vysokou frekvenci výskytu autoimunitních onemocnění v rodinách našich pacientů s JLT (44,6%) vyplývající z genetické dispozice k autoimunitní imunopatologické reakci. 59 % dětí mělo v době stanovení diagnózy JLT již hypofunkci štítné žlázy, z toho ve 46 % se jednalo o těžkou hypotyreózu s vážnými klinickými důsledky. Záchyt těžké primární hypotyreózy s myxedémem byl také u několika dětí v rodinách s jasnou genetickou dispozicí k autoimunitním onemocněním. Z toho jednoznačně vyplývá otázka dispenzarizace jedinců v takto postižených rodinách z hlediska možného vývoje autoimunitního onemocnění. Pozdní diagnóza těžké primární hypotyreózy v dětském věku může mít trvalé následky na růst a vývoj dítěte.

Nejčastěji se vyskytujícími autoimunitními chorobami v rodinách našich pacientů byly autoimunitní thyreopatie - chronická lymfocytární thyreoiditis (72%) a Graves-Basedowova choroba (15,5%). Výskyt autoimunitních onemocnění u sourozenců našich pacientů s JLT byl pozorován v 7,4 % a nečastěji se také jednalo o JLT. V našem souboru jsme tedy potvrdili nejčastější výskyt autoimunitních onemocnění štítné žlázy z autoimunitních onemocnění.

15,2 % pacientů v našem souboru mělo přidružené autoimunitní onemocnění, kdy v 5,6 % případů bylo primárně diagnostikováno jiné autoimunitní onemocnění i neendokrinních orgánů a až po té s odstupem několika let byla stanovena diagnóza JLT již s hypofunkcí štítné žlázy. Na podkladě těchto klinických zkušeností doporučujeme aktivní vyhledávání JLT u pacientů s jinou autoimunitní chorobou. Doporučujeme dále sledování vývoje orgánově specifických autoprotilátek u pacientů s diagnózou více autoimunitních chorob k časnému odhalení preklinické fáze závažné endokrinopatie jako je například autoimunitní adrenalitida nebo diabetes mellitus typu 1.

### 3.3

Posuzovali jsem imunologickou reaktivitu u studovaných skupin stanovením množství a spektra cytokinů a chemokinů bazálně a po stimulaci jejich imunokompetentních buněk lyzátem *H. pylori* a jeho lipopolysacharidem. Infekcí *H. pylori* a současnou autoimunitní thyreoiditidou s ohledem na možnou stimulační roli mikroba a jeho lipopolysacharidu na imunokompetentní periferní krevní mononukleární buňky se dosud se nikdo nezabýval.

Imunologická reaktivita k lyzátu *H. pylori* a LPS se lišila mezi studovanými skupinami. Jedinci s infekcí *H. pylori* (JLT *H. pylori* pozitivní i zdravé kontroly *H. pylori* pozitivní) vykazovali masivní chemokinovou odpověď na stimulaci krevních mononukleárních buněk lyzátem *H. pylori* i jeho lipopolysacharidem.

Děti s JLT *H. pylori* pozitivní produkují po stimulaci prozánětlivé cytokiny, zejména IL-6. Zdravé kontroly *H. pylori* negativní měly nejnižší bazální cytokinovou a chemokinovou produkci proti ostatním skupinám, ale po stimulaci *H. pylori* ve srovnání s jedinci JLT *H. pylori* pozitivními i negativními signifikantně stoupala produkce IFN- $\gamma$  (Th1 cytokin) a také regulačního cytokinu TGF- $\beta$  (Th3 cytokin).

Jedinci JLT *H. pylori* negativní měli vyšší produkci TGF- $\beta$  po stimulaci LPS ve srovnání se zdravými kontrolami *H. pylori* pozitivními, stejně tak ve srovnání s jedinci JLT *H. pylori* pozitivními.

IL-10 jako další regulační cytokin byl u skupiny zdravých kontrol *H. pylori* negativních spíše snížen, stejně jako produkce IL-5.

U pacientů JLT *H. pylori* pozitivních a *H. pylori* pozitivních zdravých kontrol byla tedy zjištěna nižší produkce regulačních cytokinů, což lze vysvětlit buď vyčerpáním jejich imunokompetentních buněk nebo negativním vlivem infekce *H. pylori*.

Uvedené testy potvrdily významný vliv infekce *H. pylori* na imunokompetentní buňky, a to zejména v případě jedinců s autoimunitní dispozicí a tudíž přítomnou imunologickou dysbalancí.

Naše výsledky ukazují na důležitou roli aktivní infekce *H. pylori* v rozvoji JLT a jsou nezbytné další studie vztahu mezi *H. pylori* a rozvojem autoimunitních onemocnění. U pacientů s JLT doporučujeme cíleně pátrat po infekci *H. pylori* a v případě positivity infekci eradikovat.

## 7. Souhrn

### 7.1

Prvním cílem studie bylo zjištění současného výskytu infekce *Helicobacter pylori* u souboru dětí s juvenilní lymfocytární thyreoiditidou (JLT) a její porovnání s prevalencí této infekce u souboru stejně starých, ale zdravých dětí.

Soubor pacientů s JLT tvořilo 199 dětí (věkové rozmezí 0-18 let). Aktivní infekce *H. pylori* byla potvrzena u 15 nemocných (7,5%) neinvazivním diagnostickým testem přítomnosti antigenu *H. pylori* ve stolici pomocí ELISA testu za použití monoklonálních protilátek (Amplified IDEIQA HpStAR ELISA, DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Tuto pozitivní skupinu tvořilo 14 dívek a 1 chlapec s průměrným věkem  $11,2 \pm 2,3$  let. U 6 dětí byla přítomna hypofunkce štítné žlázy, z toho u 3 dětí byla přítomna atrofická forma thyreoiditidy s těžkou hypotyreózou s přítomností myxedému, ostatní děti měly hypertrofickou formu thyreoiditidy. 7 dětí podstoupilo gastrokopické vyšetření, které potvrdilo chronickou aktivní gastritidu. Pouze 3 děti měly gastrointestinální potíže při *H. pylori* infekci, ostatní děti byly asymptomatické. Toto zjištění je v souladu s obecnými poznatky o asymptomatickém průběhu infekce *H. pylori* u dětí až v 90 % případů.

Kontrolní skupinu tvořil soubor 1545 asymptomatických zdravých dětí ve věku 0 – 15 roků ze stejné geografické oblasti žijících v různých oblastech (město, vesnice). Prevalence infekce *H. pylori* u zdravých českých dětí byla prokázána u 110 z 1545 dětí, tj. u 7,1 %. Byla zjištěna pozitivní asociace s věkem, ale bez závislosti na pohlaví a výskyt infekce byl častější u dětí žijících v nepříznivých socioekonomických podmínkách. Vzhledem k věkově specifické závislosti prevalence infekce *H. pylori* v dětském věku bylo současně provedeno srovnání s věkově odpovídající kontrolní skupinou (10-13 roků), kde prevalence infekce *H.pylori* dosáhla 8,2 % a nebyla tedy také signifikantně odlišná od prevalence infekce *H.pylori* v JLT skupině dětí.

Ve studii jsme tedy potvrdili srovnatelnou prevalenci infekce *H. pylori* u souboru našich pacientů s JLT (7,5%) a u asymptomatických zdravých českých dětí (7,1%).

## 7.2

Druhým cílem studie byl rozbor souboru 231 pacientů s juvenilní lymfocytární thyreoiditidou. Studovaná kritéria zahrnovala zastoupení pohlaví, věk pacientů, funkci štítné žlázy a pozitivitu autoprotilátek proti štítné žláze v době stanovení diagnózy JLT, výskyt dalších přidružených autoimunitních chorob, pozitivitu rodinné anamnézy z hlediska výskytu autoimunitních chorob a počet sourozeneckých dvojic s autoimunitními chorobami.

Ve shodě s literárními zdroji jsem potvrdili v našem souboru 231 dětí s JLT převahu postižení ženského pohlaví (77%). Tuto skutečnost také doložil rozbor rodinné anamnézy, kdy pouze v 1,3 % případů byl autoimunitním onemocněním postižen rodič nebo prarodič mužského pohlaví.

Věkové rozložení souboru v době stanovení diagnózy JLT potvrdilo nejčastější vývoj autoimunitního onemocnění v období puberty a adolescence (věk 11-18 let v době stanovení diagnózy JLT zastoupen v souboru v 66%), ale současně jsme upozornili na vývoj JLT s hypotyreózou již u velmi malých předškolních dětí.

U 60,6 % pacientů byla přítomna v době stanovení diagnózy JLT pozitivita obou specifických autoprotilátek antiTPO a antiTG. 3,5 % pacientů s JLT měli negativní autoprotilátky proti štítné žláze, což diagnózu JLT nevylučuje. Na podkladě našich klinických zkušeností s pacienty s přechodnou formou kongenitální hypotyreózy jsme zdůraznili význam vyšetřování přítomnosti blokujících antiTSH protilátek u pacientek především s atrofickou formou autoimunitní thyreoiditidy v graviditě. Pozitivita těchto protilátek predikuje možnost zablokování štítné žlázy u plodu s vývojem přechodné formy kongenitální hypotyreózy, kterou můžeme potvrdit vyšetřením TSH z pupečnickové krve a

časněji nasadit substituční terapii levothyroxinem ještě před znalostí screeningu kongenitální hypotyreózy. Tyto ženy v průběhu gravidity musí mít adekvátní substituční terapii levothyroxinem, protože plod je plně závislý po celou dobu gravidity na saturaci tyroxinem od matky.

24 % pacientů s JLT v souboru mělo pozitivní alergickou anamnézu potvrzující genetickou dispozici k imunopatologickým reakcím u těchto jedinců. Z toho vyplývá, že u dětí s pozitivní alergickou anamnézou je třeba myslet na zvýšené riziko vývoje autoimunitních onemocnění.

Potvrdili jsme vysokou frekvenci výskytu autoimunitních onemocnění u rodiče nebo prarodiče našich pacientů s JLT, a to ve 44,6 %, což dokládá genetickou dispozici k autoimunitní imunopatologické reakci v takto postižených rodinách. 59 % dětí mělo v době stanovení diagnózy JLT již hypofunkci štítné žlázy, z toho ve 46 % se jednalo o těžkou hypotyreózu s myxedémem, bradykardií, hypotenzí, poruchou růstu. V několika případech byly postižené děti z rodin s jednoznačnou genetickou dispozicí k autoimunitním onemocněním. Z toho vyplývá otázka dispenzarizace jedinců v takto postižených rodinách z hlediska možného vývoje autoimunitního onemocnění. Pozdní diagnóza těžké primární hypotyreózy v dětském věku může mít trvalé následky na růst a vývoj dítěte.

Ve shodě s literárními zdroji jsme i v našem souboru potvrdili nejčastější výskyt autoimunitních onemocnění štítné žlázy ze spektra autoimunitních onemocnění. Chronická lymfocytární thyreoiditis se v rodinách našich pacientů vyskytovala v 72 % a Graves-Basedowova choroba v 15,5 %. Výskyt autoimunitních onemocnění u sourozenců našich pacientů s JLT byl v 7,4 % a nejčastěji se také jednalo o JLT.

15,2 % pacientů v našem souboru mělo přidružené autoimunitní onemocnění, kdy v 5,6 % případů bylo primárně diagnostikováno jiné autoimunitní onemocnění i neendokrinních orgánů a až po té s odstupem několika let byla stanovena diagnóza JLT již

s hypofunkcí štítné žlázy. Doporučujeme proto aktivní vyhledávání JLT u pacientů s jinou autoimunitní chorobou a sledování vývoje orgánově specifických autoantilátek u pacientů s diagnózou více autoimunitních chorob k časnému odhalení preklinické fáze závažné endokrinopatie jako je například autoimunitní adrenalitida nebo diabetes mellitus typu 1.

### 7.3

Třetím cílem studie bylo posouzení imunologické reaktivity pacientů s juvenilní lymfocytární thyreoiditidou *H. pylori* pozitivních, negativních a u zdravých kontrol *H. pylori* pozitivních a negativních. Infekcí *H. pylori* a současnou autoimunitní thyreoiditidou s ohledem na možnou stimulační roli mikroba a jeho lipopolysacharidu na imunokompetentní periferní krevní mononukleární buňky se dosud se nikdo nezabýval. *H. pylori* je považován jako jeden z možných trigérů thyreoidální autoimunity. Předpokladem je možná zkřížená reaktivita mezi společnými antigeny *H. pylori* a antigeny štítné žlázy, tedy mechanismus „molekulární mimikry“, kdy původně protiinfekční imunita přechází v autoimunitní reakci. Těmito společnými antigeny se jeví Lewis antigeny x,y, které jsou exprimovány na beta řetězci žaludeční protonové pumpy, na žaludečním mucinu, v epiteliálních buňkách štítné žlázy, v pankreatu a obdobné antigeny exprimuje *H. pylori* na svém povrchu jako součást lipopolysacharidu.

Po izolaci krevních mononukleárních buněk z heparinizované periferní žilní krve studovaných jedinců metodou hustotní gradientové centrifugace na Ficollu byla jejich imunologická reaktivita posuzována stanovením jejich bazální produkce cytokinů a chemokinů a po stimulaci lyzátem *H. pylori* a jeho izolovaným lipopolysacharidem (Lewis antigeny) metodou proteinové microarray. Celkem bylo hodnoceno 23 cytokinů a chemokinů. Tímto způsobem bylo vyšetřeno celkem 53 pacientů s JLT (20 pacientů *H. pylori* pozitivních, 33 pacientů *H. pylori* negativních) průměrného věku 15 let (rozmezí 7-26 let) a kontrolní

skupina 40 zdravých dívek (20 dívek *H. pylori* pozitivních, 20 *H. pylori* negativních) ze stejné socioekonomické skupiny s průměrným věkem 15 let (rozmezí 7-26 let).

Imunologická reaktivita k lyzátu *H. pylori* a LPS se lišila mezi studovanými skupinami. Jedinci s pozitivní infekcí *H. pylori* (JLT *H. pylori* pozitivní i zdravé kontroly *H. pylori* pozitivní) vykazovali masivní chemokinovou odpověď na stimulaci krevních mononukleárních buněk lyzátem *H. pylori* i jeho lipopolysacharidem. Pacienti JLT *H. pylori* pozitivní produkují po stimulaci prozánětlivé cytokiny, zejména IL-6.

Zdravé kontroly *H. pylori* negativní měly proti ostatním skupinám nejnižší bazální cytokinovou a chemokinovou produkci, ale po stimulaci *H. pylori* ve srovnání s jedinci JLT *H. pylori* pozitivními i negativními signifikantně stoupala produkce IFN- $\gamma$  (Th1 cytokin) a také regulačního cytokinu TGF- $\beta$  (Th3 cytokin), který působí supresivně na produkci Th1 cytokinů.

Jedinci JLT *H. pylori* negativní měli vyšší produkci TGF- $\beta$  po stimulaci LPS ve srovnání se zdravými kontrolami *H. pylori* pozitivními, stejně tak ve srovnání s jedinci JLT *H. pylori* pozitivními.

IL-10 jako další regulační Th3 cytokin byl u skupiny zdravých kontrol *H. pylori* negativních spíše snížen, stejně jako produkce IL-5.

U pacientů s infekcí *H. pylori*, tzn. u pacientů JLT *H. pylori* pozitivních a *H. pylori* pozitivních zdravých kontrol byla tedy zjištěna nižší produkce regulačních cytokinů, což lze vysvětlit buď vyčerpáním jejich imunokompetentních buněk nebo negativním vlivem infekce *H. pylori*.

Uvedené testy tedy potvrdily významný vliv infekce *H. pylori* na imunokompetentní buňky, a to zejména v případě jedinců s autoimunitní dispozicí a tudíž přítomnou imunologickou dysbalancí. Stoupající incidence autoimunitních onemocnění včetně juvenilní lymfocytární thyreoiditidy vyžaduje jak komplexní péči o tyto pacienty s cíleným



vyhledáváním možných sdružených autoimunitních onemocnění, tak vyhledávání možných spouštěcích faktorů této imunopatologické reakce. Budou nezbytné další studie vztahu mezi infekcí *H.pylori* a rozvojem autoimunitních onemocnění. Na podkladě našich zjištění doporučujeme cíleně pátrat u pacientů s autoimunitní thyreoiditidou po infekci *H. pylori* a v případě positivity infekci eradikovat.

## 8. Summary

The first aim of our study was to find out the present occurrence of *H. pylori* infection in a group of children with juvenile lymphocytic thyroiditis (JLT) and to compare with the prevalence of this infection in a group of healthy children of the same age.

The group of patients with JLT included 199 children (range 0-18 years). *H. pylori* infection was confirmed in 15 patients (7,5%) by a non-invasive diagnostic test of *H. pylori* antigen positivity in stools by the ELISA test using monoclonal antibodies (Amplified IDEIQA HpStAR ELISA, DakoCytomation, Glostrup, Denmark). This *H.pylori* positive group included 14 girls and 1 boy aged  $11,2 \pm 2,3$ . 6 children had hypofunction of the thyroid gland, in 3 children was established the atrophic form of the thyroiditis with severe hypothyroidism with presence of myxoedema, the other children suffered from the hypertrophic form of the thyroiditis. 7 subjects underwent gastroscopy which confirmed chronic active gastritis. Only 3 children had gastrointestinal symptoms caused by *H. pylori* infection, the other children were asymptomatic. This finding confirms common information about asymptomatic development of *H. pylori* infection in children in 90% of cases.

The control group included 1545 asymptomatic healthy children in range of 0-15 years of the same geographic region living in different regions (town, village). The prevalence of *H. pylori* infection in healthy children was confirmed in 110 out of 1545 children (7,1%). We found positive correlation with age, but without dependence on sex and the occurrence of this infection was significantly more often in children living in low socioeconomic conditions. As specific dependence of the prevalence of *H. pylori* infection on the age in children was confirmed we made a comparison to a control group of healthy children of the same age (range 10-13 years), where the prevalence of *H. pylori* infection reached 8,2 % and wasn't different from the prevalence of *H. pylori* infection in group of children with JLT too. We

also confirmed the comparable prevalence of *H. pylori* infection in group of our patients with JLT (7,5%) and in asymptomatic healthy children (7,1%).

The second objective of our study was the analysis of the the group of 231 patients with JLT. The studied criteria were: sex, age, function of the thyroid gland, positivity of autoantibodies at the time of diagnosis, occurrence of other autoimmune diseases and the number of siblings with autoimmune diseases.

According to published data we also confirmed the majority of female sex in our group of 231 children with JLT. This fact was also confirmed by the analysis of the family history where only 1,3 % parents or grandparents of male sex suffered from autoimmune diseases.

The range of age in our group at the time of diagnoses of JLT confirmed the most frequent development of autoimmune disease during the puberty and adolescence (the range of 11-18 years was in 66%). On the other hand this disease is present in very young pre-school children. We pointed out that this fact mustn't be underestimated.

The positivity of both specific autoantibodies (antiTPO and antiTG) was present in 60,6 % patients at the time of diagnoses of JLT. The negativity of both specific autoantibodies was present in 3,5 % patients with JLT which doesn't exclude the diagnosis of JLT. Based on our clinical experience with the patients with transient form of congenital hypothyroidism we emphasized the importance of the investigation of blocked antiTSH antibodies especially in female sex patients with the atrophic form of autoimmune thyroiditis in pregnancy. The positivity of these antibodies predict the possibility of blocking the thyroid gland in foetus with development of transient form of congenital hypothyroidism. We can confirm this diagnosis by measuring TSH in umbilical blood and start therapy with levothyroxine sooner before the result of screening of congenital hypothyroidism. These women must have

adequate substitution with levothyroxine because of dependence of foetus on mother's saturation with thyroxine during the pregnancy.

24 % of patients with JLT in the group had positive allergic history confirming genetic predisposition to various immunopathological reactions in these individuals. This fact confirms higher risk of development of autoimmune diseases in children with positive history of allergy.

We confirmed high frequency of autoimmune diseases in parent or grandparent of our patients with JLT (44,6%), which confirms genetic disposition to autoimmune immunopathological reaction in such affected families.

At the time of JLT diagnosis, 59 % of children had already hypofunction of the thyroid gland, 46 % of which had severe hypothyroidism with myxoedema , bradycardia, hypotension, growth retardation. In several cases, the affected children were from families with unambiguous genetic disposition to autoimmune diseases. This fact leads to the question of the follow-up of individuals in these affected families due to possible development of autoimmune disease. A late diagnosis of severe primary hypothyroidism in childhood can have permanent aftereffects on the growth and development of the child.

According to published data, in our group we confirmed the most frequent occurrence of autoimmune diseases of the thyroid gland from the spectrum of autoimmune diseases. The prevalence of chronic lymphocytic thyroiditis in families of our patients was 72 % and the prevalence of Graves-Basedow disease was 15,5 %. The prevalence of autoimmune diseases in siblings of our patients with JLT was present in 7,4 % of cases and the most frequent was JLT too.

The associated autoimmune disease was present in 15,2 % of patients in our group. In 5,5 % of the cases, another autoimmune disease of non-endocrine organs was first diagnosed, and then after several years was established the diagnosis of JLT with

hypofunction of the thyroid gland. We recommend consequent searching out JLT in patients with other autoimmune disease and the follow-up of the development of organ specific autoantibodies in patients with diagnosis of more autoimmune diseases in order to make an early diagnosis of pre-clinical period of serious endocrinopathy such as autoimmune adrenalitis or type 1 diabetes mellitus.

The third aim of our study was the determination of immunoreactivity in patients with JLT *H. pylori* positive, negative and in a healthy control group *H. pylori* positive and negative. To our best knowledge so far, nobody has been interested in *H. pylori* infection and present autoimmune thyroiditis regarding a possible stimulating role of the microbe and its lipopolysaccharide (LPS) on immunocompetent peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *H. pylori* can be one of the possible triggers of thyroid autoimmunity. The hypothesis is a possible cross reactivity between *H. pylori* antigens and thyroid gland antigens, it means „molecular mimicry“ phenomenon, when originally antiinfectious immunity becomes autoimmunity. These common antigens seem to be Lewis antigens x,y which are expressed on beta-chain of gastric proton pump, on gastric mucin, in epithelial cells of the thyroid gland, in pancreas and similar antigens are expressed on *H. pylori* surface as part of lipopolysaccharide.

After isolation of PBMC from the peripheral blood of the studied individuals by Ficoll density gradient centrifugation, their immunoreactivity was analysed by determination of basal cytokine and chemokine production and after stimulation with *H.pylori* and its lipopolysaccharide (Lewis antigens) using the method of protein microarray. We analysed the production of 23 cytokine and chemokine.

We examined 53 patients with JLT (20 patients *H.pylori* positive, 33 patients *H.pylori* negative) of average age of 15 years (range 7-26 years) and a control group of 40 healthy

girls (20 girls *H. pylori* positive, 20 girls *H. pylori* negative) from the same socio-economical group. The immunoreactivity to *H.pylori* and to its LPS differed between studied groups.

The individuals with positive *H. pylori* infection (JLT *H. pylori* positive group and *H. pylori* positive healthy control group) reacted by massive chemokine response to *H.pylori* lysate and to its LPS after stimulation blood mononuclear cells. JLT *H. pylori* positive patients produce upon stimulation proinflammatory cytokines, mainly IL-6.

*H. pylori* negative healthy controls had the lowest basal cytokine and chemokine production, but in comparison to JLT *H. pylori* positive and negative individuals significantly increased production of IFN- $\gamma$  (Th1 cytokine) and regulatory cytokine TGF- $\beta$  too (Th3 cytokine), which suppresses production of Th1 cytokines.

JLT *H. pylori* negative patients had a higher production of TGF- $\beta$  to LPS stimulation in comparison to *H.pylori* positive healthy controls, as well as in comparison to JLT *H.pylori* positive patients.

The production of IL -10 as another regulatory Th3 cytokine was in *H.pylori* negative healthy controls rather decreased, as well as the production of IL-5.

In patients with *H.pylori* infection, it means in patients JLT *H. pylori* positive and *H.pylori* positive healthy controls was observed a lower production of regulatory cytokines, which can be explained either by exhaustion of their immunocompetent cells or by negative influence of *H.pylori* infection.

These tests confirmed significant influence of *H.pylori* infection on immunocompetent cells, especially in individuals with autoimmune disposition and consequently with present immune dysbalance. An increasing incidence of autoimmune diseases including juvenile lymphocytic thyroiditis requires both complex care of these patients, together with searching out possible associated autoimmune diseases and searching out possible triggers of this immunopathological reaction. As a result of our findings we recommend in patients with

autoimmune thyroiditis active searching out *H.pylori* infection and, in case of positivity, eliminating this infection.

**Key words:** Helicobacter pylori, autoimmune thyroiditis, cytokine, chemokine, Helicobacter pylori stool antigen, chronic gastritis, digestive endoscopy

**Poděkování:**

*Doc. MUDr. J. Kobr, Ph.D.*

*Doc. MUDr. J. Sýkora, Ph.D.*

*Doc. MUDr. K. Štechová, Ph.D.*

*Doc. MUDr. J. Varvařovská, Ph.D.*

*Ing. J. Hrabák, Ph.D.*

*M. Maidlová, L. Hájková, M. Procházková, J. Kozáková, lékaři a sestry DK FN a LF UK  
Plzeň*

*Mojí rodině*



## Literatura autora se vztahem k řešené problematice

1. Štechová K., Pomahačová R., Hrabák J., Durilová M., Sýkora J., Chudoba D., Šťavíková V., Flajšmanová K., Varvařovská J. Reactivity to *Helicobacter pylori* antigens in patients suffering from thyroid gland autoimmunity. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 117 (8), 2009, s. 423-431. **(IF 1.745)**

2. Pomahačová R., Štechová K., Hrabák J., Sýkora J., Varvařovská J. Autoimmune thyroiditis in children and the role of simultaneous *Helicobacter pylori* infection. 46 th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology, Helsinki, Finland 27-30 June 2007. *Horm Res* 2007, 68, Suppl 1, s. 60. **(IF 2.015)**

**Poster byl nominován mezi 50 nejlepších posterů kongresu na „cenu prezidenta ESPE“.**

3. Štechová K., Pomahačová R., Flajšmanová K., Hrabák J., Durilová M., Bohmová K., M., Sýkora J., Varvařovská J. Role of *Helicobacter pylori* infection in pathogenesis of autoimmune thyroiditis. 17 th Meeting of ES-PCR (Central European countries of Pediatric Research), Innsbruck, Austria, 19-21 June 2008. Abstracts book, s. 18. Oral presentation.

4. Sýkora J., Pomahačová R., Štechová K., Hrabák J., Varvařovská J., Huml M. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in juvenile lymphocytic thyroiditis in childhood and its role in the development of autoimmunity. European Helicobacter Study Group, XX. th International Workshop, Istanbul 20-22 September 2007. *Helicobacter* 12, s. 457- 458  
**(IF 2.423)**

5. Štechová K., Pomahačová R., Flajšmanová K., Hrabák J., Sýkora J., Durilová M., Bohmová K., Varvařovská J. Possible relationship between *Helicobacter pylori* infection and occurrence of autoimmune thyroiditis. 6 th International congress on autoimmunity, Porto, Portugal, 10-14 September 2008. Poster No 38, s. 132.

6. Štechová K., Pomahačová R., Hrabák J., Sýkora J., Durilová M., Bohmová K., Chudoba D., Šťavíková V., Tesařová-Flajšmanová K., Ulmannová T., Varvařovská J. Cytokine response to *Helicobacter pylori* antigens in autoimmune thyroiditis patients. International congress on cytokines in immune regulation and disease. Florence, Italy, 4-6 December 2008. Abstracts book, s. 71
7. Pomahačová R., Štechová K., Hladíková Z., Hrabák J., Sýkora J., Flajšmanová K., Durilová M., Varvařovská J. Vztah infekce bakterií *Helicobacter pylori* ke vzniku JLT. XXX. Endokrinologické dny s mezinárodní účastí, Špindlerův Mlýn, 4.-6. října 2007. Sborník abstrakt, s. 113- 114
8. Štechová K., Pomahačová R., Flajšmanová K., Durilová M., Hrabák J., Šťavíková V., Sýkora J., Varvařovská J. Reaktivita na antigeny *Helicobacter pylori* u pacientů s autoimunitní thyreoiditidou. XXV. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů, XII. Kongres českých a slovenských imunologů s mezinárodní účastí. Praha, 29. října- 1. listopadu 2008. Alergie, časopis pro kontinuální vzdělávání v alergologii a klinické imunologii, ročník 10, supplementum 2, 2008, s. 100 – 101.
9. Pomahačová R., Štechová K., Hladíková Z., Hrabák J., Sýkora, J., Flajšmanová K., Durilová M., Varvařovská J. Vztah infekce bakterií *Helicobacter pylori* ke vzniku juvenilní lymfocytární thyreoiditidy. VII. Český pediatrický kongres s mezinárodní účastí, Jihlava, 25.-27. září 2008. Česko-slovenská pediatrie, ročník 63, s. 438
10. Sýkora J., Siala K., Varvařovská J., Pazdiora P., Pomahačová R., Huml M. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection in Asymptomatic Children: A Prospective Population-Based Study from the Czech Republic. Application of a Monoclonal-Based Antigen-in-Stool Enzyme Immunoassay. *Helicobacter* 2009, 14, s. 286-297. **(IF 2.423)**
11. Sýkora J., Pazdiora P., Varvařovská J., Pomahačová R., Stožický F., Siala K. Současná epidemiologicko-klinická problematika infekce *Helicobacter pylori* v dětském věku. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie* 55, 2006, č. 1, s. 3-16

12. Sýkora J., Siala K., Huml M., Varvařovská J., Schwarz J., Pomahačová R. Evaluation of fecal calprotectin as a valuable non-invasive marker in distinguishing gut pathogens in young children with acute gastroenteritis. *Acta Paediatrica* 2010
13. Sýkora J., Pomahačová R., Stožický F. Poruchy růstu u dětí s onemocněním zažívacího traktu. *Čes-Slov Pediat* 2000, 55, s. 620-623
14. Sýkora J., Pazdiora P., Varvařovská J., Valečková K., Siala K., Schwarz J., Stožický F., Pomahačová R. Epidemiologie infekce *Helicobacter pylori* v České republice v dětském věku (1-15 let): prospektivní populačně založená studie. *Plzeňský lékařský sborník*, 2005, suppl 80, s. 87-89
15. Sýkora J., Táborská V., Pomahačová R., Špidlen V., Varvařovská J. Duodenal ulcer perforation in a 20-month-old: an unusual complication of *Haemophilus influenzae* type b meningitis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2002
16. Sýkora J., Huml M., Siala K., Lád V., Pomahačová R. Fistulizing Anorectal Crohn Disease in Child With Severe HLA-B27-Associated Enthesitis-Related Arthritis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2009, 48, s. 1-4
17. Sýkora J., Pomahačová R., Siala K., Huml M., Varvařovská J. *H. pylori* Infection in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes mellitus. *Helicobacter* 2008, 13, s. 446.  
**(IF 2.423)**
18. Štechová K., Pomahačová R., Hrabák J., Šťavíková V., Ulmannová T., Sýkora J., Varvařovská J. Cytokine environment and *Helicobacter pylori* colonisation in children with organ specific autoimmune diseases (**zasláno k publikaci do *Pediatric Research* v r. 2010**)  
**(IF 2.604)**
19. Varvařovská J., Siala K., Pomahačová R., Sýkora J., Stožický F., Rušavý Z. Mastering the treatment of diabetes mellitus type 1 in childhood and adolescence. *Current Pediatric Reviews* 2007, 3 (2), s. 129-139.

20. Varvařovská J., Racek J., Štětina R., Sýkora J., Pomahačová R., Rušavý Z., Lacigová S., Stožický F. Aspects of oxidative stress in children with Type 1 diabetes mellitus. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2004, 58 (10), s. 539-545. (IF 2.61)

21. Sýkora J., Varvařovská J., Pomahačová R., Siala K., Stožický F. Simultaneous presentation of celiac disease, ulcerative colitis and autoimmune thyroiditis in childhood. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2004, 38 (7), s. 613-614. (IF 2.96)

### **Literatura použitá se vztahem k řešené problematice**

1. Andersen LP. Colonization and infection by *Helicobacter pylori* in humans. *Helicobacter* 2007, 12 (Suppl 2), s. 12-15

2. Aspinall GO., Monteiro MA. Lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* strains P466 and MO19: structures of the O antigen and core oligosaccharide regions. *Biochemistry* 1996, 35, 2498-504

3. Barrio R., Roldan MB., Alonso M., Canton R., Camarero C. *Helicobacter pylori* infection with parietal cell antibodies in children and adolescents with insulin dependent diabetes mellitus. *J. Pediatr Endocrinol Metab* 1997, 10, s. 511-516

4. Bergman MP., Engering A., Smits HH et al. *Helicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *J Exp Med* 2004, 200 (8), s. 979-990

5. Brown RS., Bellisario RL., Botero D., Fournier L., Abrams CA, Cowger ML et al. Incidence of transient congenital hypothyroidism due to maternal thyrotrophin receptor-blocking antibodies in over one million babies. *Journal of clinical Endocrinology and Metabolism* 1996, 81, s. 1147-1151

6. Candeli M., Rigante D., Marietti G et al. *Helicobacter pylori*, gastrointestinal symptoms, and metabolic control in young type 1 diabetes mellitus patients. *Pediatrics* 2003, 111 (4 Pt1), s. 800-803
7. Caturegli P., Kimura H., Rocchi R et al. Autoimmune thyroid disease. *Curr Opin Rheumatol* 2007, 19 (1), s. 44-48
8. Centanni M., Marignani M., Gargano L., Corleto VD., Casini A., Delle Fave G., Andreoli M., Annibale B. Atrophic body gastritis in patients with autoimmune thyroid disease. *Arch Intern Med* 1999, 159, s. 1726-30
9. Clays D., Faller G., Appelmelk BJ., Negrini R., Kirchner T., The gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase is a major autoantigen in chronic *Helicobacter pylori* gastritis with body mucosa atrophy. *Gastroenterology* 1998, 115, s. 340-7
10. D'Elis MM., Manghetti M., Almerigogna F et al. Different cytokine profile and antigen-specificity repertoire in *Helicobacter pylori*-specific T cell clones from the antrum of chronic gastritis patients with or without peptic ulcer. *Eur J Immunol* 1997, 27 (7), s. 1751-1755
11. de Luis DA., Varela C., de La Calle H et al. *Helicobacter pylori* infection is markedly increased in patients with autoimmune atrophic thyroiditis. *J Clin Gastroenterol* 1998, 26 (4), s. 259-263
12. Egan BJ., Holmes K., O Connor HJ et al, *Helicobacter pylori* gastritis, the unifying concept for gastric disease. *Helicobacter* 2007, 12 (Suppl 2), s. 39-44
13. Emilia G., Longo G., Luppi M et al. *Helicobacter pylori* eradication can induce platelet recovery in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2001. 97, s. 812-14
14. Evans C., Jordan N J., Owens G., Bradley D., Ludgate M., John R. Potent thyrotrophin receptor-blocking antibodies: a cause of transient congenital hypothyroidism and delayed thyroid development. *European Journal of Endocrinology* 2004, 150, s. 265-268

15. Figura N., Di Cairano G., Lore F et al, The infection by *Helicobacter pylori* strains expressing cagA is highly prevalent in women with autoimmune thyroid disorders. *J Physiol Pharmacol* 1999, 50 (5), s. 817-826
16. Fountoulakis S., Tsatsoulis A. On the pathogenesis of autoimmune thyroid disease: a unifying hypothesis. *Clin Endocrinol* 2004, 60 (4), s. 397-409
17. Gruver AL., Hudson LL., Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. *J Pathol* 2007, 211 (2), s. 144-156
18. Guariso G., Brotto F., Basso D., Alaggio R., Betterle C. Organ-Specific Autoantibodies in Children with *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, 2004, 9, s. 622-628
19. Klecha AJ., Barrerio Arcos ML., Frick L et al. Immune-endocrine interactions in autoimmune thyroid diseases. *Neuroimmunomodulation* 2008, 15 (1), s. 68-75 Epub 2008 Jul 29
20. Kuipers EJ. *Helicobacter pylori* and the risk and management of associated diseases: gastritis, ulcer disease, atrophic gastritis and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1997, 11, s. 71-88
21. Larizza D., Cacaterra V., Martinetti M et al. *Helicobacter pylori* infection and autoimmune thyroid disease in young patients: the disadvantage of carrying the human leukocyte antigen-DRB1\*0301 allele. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91 (1), s. 176-179 Epub 2005 Nov 1
22. Límanová Z. et al. Trendy soudobé endokrinologie 2, Štítná žláza, Galén 2006, s. 170-176, 267-278
23. Luchi M., Morrison D. Comparable endotoxic properties of lipopolysaccharides are manifest in diverse clinical isolated of gram-negative bacteria. *Infect Immun* 2000, 68, (4), s. 176-179 Epub 2005 Nov 1

24. Malfertheiner P., Megraus F., O'Morain C et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007, 56 (6), s. 772-781 Epub 2006 Dec 14
25. Marollo M., Latella G., Melideo D., Storelli E., Ianarelli R., Stornelli P., Valenti M., Caprilli R. Increased prevalence of *Helicobacter pylori* in patients with diabetes mellitus. *Dig Liver Dis* 2001, 33, s. 21-9
26. Mattapallil JJ., Dandekar S., Canfield DR et al. A predominant Th1 type of immune response is induced early during acute *Helicobacter pylori* infection in rhesus macaques. *Gastroenterology* 2000, 118 (2), s. 307-315
27. Nilsson T., Lapidus L., Lindstedt G et al. Relations between *Helicobacter pylori*, thyroid disease and cardiovascular risk factors in a 56-65-year-old population. *Scand J Prim Health Care* 2000, 18 (2), s. 111-112
28. Presotto F., Sabini B., Cecchetto A., Plebani M., De Lazzari F., Pedini B., Betterle C. *Helicobacter pylori* infection and autoimmune diseases: is there a link? *Helicobacter* 2003, 8, s. 578-84
29. Segni M., Borrelli O., Pucarelli I et al. Early manifestations of gastric autoimmunity in patients with juvenile autoimmune thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89, s. 4944-4948
30. Sheu S.M., Sheu B-S., Yang H-B et al. Anti-Lewis X antibody Promotes *Helicobacter pylori* Adhesion to Gastric Epithelial Cells. *Infect Immun* 2007, 75 (6), s. 2661-2667
31. Simoons-Smit IM, Appelmelk BJ, Verboom T et al. Typing of *Helicobacter pylori* with monoclonal antibodies against Lewis antigens in lipopolysaccharide. *J Clin Microbiol* 1996, 34, s. 2196-2200
32. Šterzl I., Hrdá P., Potužníková B et al. Autoimmune thyroiditis and *Helicobacter pylori* infection- is there connection? *Neuro Endocrinol Lett* 2006, 27 (Suppl 1), s. 41-45

33. Šterzl I., Hrdá P., Matucha P et al. Autoimmune thyroiditis- selected etiopathogenic mechanism. *Vnitřní Lékařství* 2006, 52 (10), s. 891-6-898-9
34. Šterzl I., *Přehledná imunoendokrinologie*, Maxdorf 2006, s. 64-80
35. Sýkora J., Pazdiora P., Varvařovská J. et al. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in childhood, demographic, and socioeconomic factors: result of a population based study by monoclonal stool antigen test from Czech Republic. *Helicobacter* 2005, 10, s. 517
36. Sýkora J., Hejda V., Varvařovská J. et al. *Helicobacter heilmannii* gastroduodenal disease and clinical aspects in children with dyspeptic symptoms. *Acta Paediatrica* 2004, 93, s. 707-709
37. Sýkora J., Siala K., Varvařovská J., Pazdiora P., Pomahačová R., Huml M. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection in Asymptomatic Children: A Prospective Population-Based Study from the Czech Republic. Application of a Monoclonal-Based Antigen-in-Stool Enzyme Immunoassay. *Helicobacter* 2009, 14, s. 286-297
38. Sýkora J., Pazdiora P., Varvařovská J., Pomahačová R., Stožický F., Siala K. Současná epidemiologicko-klinická problematika infekce *Helicobacter pylori* v dětském věku. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie* 55, 2006, č. 1, s. 3-13
39. Sýkora J., Valečková K., Stožický F., Schwarz J., Varvařovská J. Diagnostika infekce *Helicobacter pylori* v dětském věku novou enzymoimunoanalytickou metodou stanovením antigenu ve stolici (HpSTAR) pomocí monoklonálních protilátek. *Čas Lék čes* 2003, 142, s. 687-690
40. Sýkora J., Valečková K., Amlerová J. et al. Effects of a specially fermented milk produkt containing probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 and the eradication of *H. pylori* in children: a prospective randomized double-blind study. *J Clin Gastroenterol* 2005, 39, s. 692-698.



41. Tomasi PA., Dore MP., Fanciulli G et al. Is there anything to the reported association between *Helicobacter pylori* infection and autoimmune thyroiditis? *Dig Dis Sci* 2005, 50 (2), s. 385-388
42. Weetman AP. Autoimmune thyroid disease, *Autoimmunity* 2004, 37 (4), s. 337-340
43. Weetman APOD. Cellular immune response in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol* 2004, 61 (4), s. 405-413
44. Zakarija M., McKenzie JM, Eidson MS. Transient neonatal hypothyroidism: characterisation of maternal antibodies to the thyrotrophin receptor. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1990, 70, s. 1239-1246
45. Zapletalová J., Lebl J., Šnajderová M. Turnerův syndrom, *Galén* 2003, s. 104-106
46. de Diego JL, Gerold G, Zychlinsky A. Sensing, presenting, and regulating PAMPs. *Ernst Schering Found Symp Proc.* 2007;(3):83-95.
47. Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Jan;1183:211-21.