

**UNIVERZITA KARLOVA  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI**

**HABILITAČNÍ PRÁCE**

**MUDr. Renata Pomahačová, Ph.D.**

**PLZEŇ 2019**

**UNIVERZITA KARLOVA  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI  
DĚTSKÁ KLINIKA**



**KOMENTOVANÝ SOUBOR UVEŘEJNĚNÝCH VĚDECKÝCH  
PRACÍ V DĚTSKÉ ENDOKRINOLOGII A DIABETOLOGII**

**COMMENTARIES ON PUBLISHED SCIENTIFIC PAPERS IN  
PAEDIATRIC ENDOCRINOLOGY AND DIABETOLOGY**

**HABILITAČNÍ PRÁCE**

**MUDr. RENATA POMAHAČOVÁ, Ph.D.**

**PLZEŇ 2019**

# OBSAH

ÚVOD.....	5
<b>1. ŠTÍTNÁ ŽLÁZA.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Autoimunitní tyreoiditida v dětství a adolescenci; sdružená autoimunitní onemocnění; familiární výskyt autoimunitních onemocnění; autoimunitní tyreoiditida jako rizikový faktor pro vývoj karcinomu štítné žlázy.....</b>	<b>8</b>
1.1.1. Autoimmune diseases, familial clustering and thyroid carcinoma coexistent with autoimmune thyroiditis in children and adolescence: A cross-sectional study from the Czech Republic.....	16
1.1.2. Sdružená autoimunitní onemocnění v dětském věku.....	21
1.1.3. Simultaneous presentation of celiac disease, ulcerative colitis and autoimmune thyroiditis in childhood.....	25
<b>1.2. Posouzení imunologické reaktivity pacientů s chronickou lymfocytární tyreoididou k antigenům <i>Helicobacter pylori</i>; epidemiologie a symptomatologie infekce <i>Helicobacter pylori</i> .....</b>	<b>27</b>
1.2.1. Reactivity to <i>Helicobacter pylori</i> antigens in patients suffering from thyroid gland autoimmunity.....	39
1.2.2. Epidemiology of <i>Helicobacter pylori</i> infection in asymptomatic children: A prospective population-based study from the Czech Republic. Application of a monoclonal-based antigen-in-stool enzyme immunoassay.....	48
1.2.3. Paediatric Rome III criteria-related abdominal pain is associated with <i>Helicobacter pylori</i> and not with calprotectin.....	60
<b>2. NADLEDVINY.....</b>	<b>66</b>
<b>2.1. Vrozená adrenální hyperplazie způsobená defektem 1. kroku steroidogeneze v důsledku mutace <i>STAR</i> genu a <i>CYP11A1</i> genu; první pacient s mutací v <i>CYP11A1</i> genu v České republice.....</b>	<b>67</b>
2.1.1. First case report of rare congenital adrenal insufficiency caused by mutations in the <i>CYP11A1</i> gene in the Czech Republic.....	71
2.1.2. Nové genetické příčiny primární adrenální insuficience.....	75
<b>2.2. Cushingův syndrom v dětském věku; příčiny, klinický obraz; diagnostika; léčba .....</b>	<b>79</b>
2.2.1. Cushingova nemoc v dětském věku- kazuistika.....	83

2.2.2. Cushingův syndrom v dětském věku.....	87
<b>3. GONÁDY.....</b>	<b>90</b>
<b>3.1. Pohlavní diference; syndrom úplné androgenní insenzitivity; mutace v genu pro androgenní receptor; genetické, klinické a etické aspekty onemocnění.....</b>	<b>91</b>
3.1.1. Late diagnosis of Complete Androgen Insensitivity Syndrome and Transmission/Carriers of the Disease in a Family with mutation c.2495G>T p.(Arg832Leu) in exon 7 of the androgen receptor gene: genetic, clinical and ethical aspects.....	95
3.1.2. Překvapivá diagnóza vzácné endokrinní choroby při vyšetření dítěte pro malý vzrůst.....	99
<b>4. DIABETES MELLITUS.....</b>	<b>102</b>
<b>4.1. Thiamin-responzivní megaloblastická anemie jako vzácná forma monogenního diabetu mellitu; příčina neonatálního diabetu mellitu; mutace <i>SLC19A2</i> genu s poruchou funkce membránového přenašeče thiaminu do buňky; první 2 pacienti popsání v České republice; nová mutace v <i>SLC19A2</i> genu, c.204+2T&gt;G v intronu 1.....</b>	<b>103</b>
4.1.1. First 2 cases with thiamine-responsive megaloblastic anemia in the Czech Republic, a rare form of monogenic diabetes mellitus: a novel mutation in the thiamine transporter <i>SLC19A2</i> gene- intron 1 mutation c.204+2T>G.....	107
4.1.2. Recessive <i>SLC19A2</i> mutations are a cause of neonatal diabetes mellitus in thiamine- responsive megaloblastic anaemia.....	111
4.1.3. Pharmacogenomics in diabetes: outcomes of thiamine therapy in TRMA syndrome.....	119
<b>4.2. Monogenně podmíněný diabetes MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young) v dětském věku.....</b>	<b>129</b>
4.2.1. Monogenně podmíněný diabetes MODY v dětském věku: retrospektivní studie pacientů diagnostikovaných na Dětské klinice FN Plzeň v letech 2000-2017.....	134
<b>4.3. Oxidační stres u diabetu mellitu typu 1 u dětí a jejich prvostupňových příbuzných; suplementace vitamínem E a C; poškození a reparace DNA.....</b>	<b>140</b>
4.3.1. Parameters of oxidative stress in children with Type 1 diabetes mellitus and their relatives.....	143
4.3.2. Aspects of oxidative stress in children with type 1 diabetes mellitus.....	147
<b>4.4. Diabetes mellitus typu 1 a gastrointestinální hormony v dětském věku.....</b>	<b>154</b>
4.4.1. Gut peptide hormones and pediatric type 1 diabetes mellitus.....	158

<b>5. PORUCHY KALCIUM-FOSFÁTOVÉHO METABOLISMU</b> .....	170
<b>5.1. Albrightova hereditární osteodystrofie; kožní a podkožní léze; pseudohypoparatyreóza typu Ia, pseudopseudohypoparatyreóza; klinická, histopatologická a molekulárně genetická studie 4 pacientů s touto diagnózou; nová mutace v <i>GNAS1</i> genu</b> .....	171
5.1.1. Cutaneous and superficial soft tissue lesions associated with Albright hereditary osteodystrophy: clinicopathological and molecular genetic study of 4 cases, including a novel mutation of the <i>GNAS</i> gene.....	174
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	182
SEZNAM CITACÍ.....	184
PODĚKOVÁNÍ.....	191

# ÚVOD

Obor pediatrie a subspecializace, dětská endokrinologie a diabetologie se jako každý medicínský obor dynamicky rozvíjí a poslední desetiletí je ve znamení radikálních změn. S rozvojem molekulárně biologických metod přibývá stále nových poznatků o etiologii a patogenezi řady onemocnění a rozšiřují se diagnosticko-léčebné možnosti. Perspektivy rozvoje dětské endokrinologie a diabetologie, která má dlouhou tradici na Dětské klinice Fakultní nemocnice a Lékařské fakultě UK v Plzni vidíme, kromě aplikace nových metod do rutinního vyšetřování v klinické praxi, zejména v oblasti vývoje nových generací léčiv, ve využití nových technologií v diabetologii, ve využití poznatků molekulární genetiky v diagnostice onemocnění s optimalizací terapie, v individualizaci terapie a v mezioborové spolupráci.

Předkládaná habilitační práce nazvaná „Komentovaný soubor uveřejněných vědeckých prací v dětské endokrinologii a diabetologii“ je sestaven formou komentovaných publikací, na kterých jsem se podílela jako první autor nebo spoluautor. Všechny komentované práce jsou v plném znění ve formě reprintu přílohou komentovaného souboru. Jedná se o 20 prací převážně v angličtině psaných, které vyšly v časopise se známým impact faktorem nebo v domácích odborných recenzovaných periodících.

Konkrétně jde o publikace:

- v evropských časopisech (Journal of Experimental Clinical Endocrinology & Diabetes, Biomedical Papers, Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, Pediatric Diabetes, Diabetologia, Physiological Research)

- v amerických časopisech (Helicobacter, Journal of Clinical Gastroenterology, American Journal of Dermatopathology, Journal of Diabetes and its Complications, Biomedicine and Pharmacotherapy)

Tématicky je celá práce rozčleněna do 5 částí: štítná žláza, nadledviny, gonády, diabetes mellitus a poruchy kalcium-fosfátového metabolismu. Jednotlivé části habilitační práce jsou dále členěny do podkapitol, které jsou uvedeny obecným komentářem a dále komentářem jednotlivých prací. Některé práce jsou komentovány jednotlivě. Komentované publikované práce převážně integrují současné pokroky v dětské endokrinologii a diabetologii a

společným pojítkem všech komentovaných publikací jsou metabolicko-genetické a klinicko-imunologické aspekty endokrinních chorob v dětském věku.

# **SOUBOR KOMENTOVANÝCH PUBLIKACÍ**



# **1. ČÁST**

## **ŠTÍTNÁ ŽLÁZA**

## **1.1. Autoimunitní tyreoiditida v dětství a adolescenci; sdružená autoimunitní onemocnění; familiární výskyt autoimunitních onemocnění; autoimunitní tyreoiditida jako rizikový faktor pro vývoj karcinomu štítné žlázy**

(komentář 3 publikací)

### **1.1.1. Autoimmune diseases, familial clustering and thyroid carcinoma coexistent with autoimmune thyroiditis in children and adolescence: A cross-sectional study from the Czech Republic**

Pomahacova R, Zamboryova J, Paterova P, Fiklik K, Cerná Z, Lad V, Skalicka E, Huml M, Sykora J.

*Biomedical Papers*, 2018, 162(4): 289-293. DOI: 10.5507/bp2018.061.

### **1.1.2. Sdružená autoimunitní onemocnění v dětském věku**

#### **Associated autoimmune disorders in childhood**

Pomahačová R, Sýkora J, Paterová P, Fiklík K, Schwarz J, Lád V, Skalická E, Černá Z, Zamboryová J.

*Pediatric pro praxi*, 2015, vol. 16, no. 2, p. 78-81.

### **1.1.3. Simultaneous presentation of celiac disease, ulcerative colitis and autoimmune thyroiditis in childhood**

Sýkora J, Varvařovská J, Pomahačová R, Siala K, Stožický F.

*Journal of Clinical Gastroenterology*, 2004, Aug vol. 38, no. 7, p. 613-614.

Autoimunitní tyreoiditida (AIT), nebo chronická lymfocytární tyreoiditida (CLT), je nejčastější onemocnění štítné žlázy a nejčastější autoimunitní onemocnění v dětském věku, s převahou postižení u ženského pohlaví. Gravesova-Basedowova choroba (GB) je méně častá. K vývoji AIT dochází především v období puberty a adolescence. Existuje hypertrofická forma AIT se strumou (Hashimotova tyreoiditida) a atrofická forma AIT (atrofická tyreoiditida) (1). Riziko vývoje AIT je v 70% genetické a spolu s faktory zevního prostředí u vnímavých jedinců spouští autoimunitní reakci (1). Ukazateli autoimunní destrukce štítné žlázy jsou protilátky proti tyreoidální peroxidáze (anti TPO) a protilátky proti tyreoglobulinu (anti TG). Blokuující protilátky proti receptorům pro tyreotropní hormon (anti rTSH) jsou přítomny u 18% dětí a adolescentů s těžkou primární hypotyreózou. Přetrvávající blokuující anti rTSH u žen v graviditě predikují možný vývoj přechodné formy kongenitální hypotyreózy u novorozence (2). Při ultrasonografickém vyšetření štítné žlázy je pro AIT

typická změněná echostruktura štítné žlázy s hypoechogenicitou. AIT je jedním z rizikových faktorů vývoje papilárního karcinomu štítné žlázy (PTC). U pediatrických pacientů není o současném výskytu PTC a AIT dostatek literárních zdrojů (3-5). Funkce štítné žlázy je v době stanovení diagnózy AIT většinou normální nebo snižená, vzácně je zvýšená. Těžká hypofunkce štítné žlázy může vést k poruše růstu a vývoje dítěte (6,7). Pacienti s AIT mohou mít současně jiné přidružené autoimunitní onemocnění (AO), orgánově specifické nebo orgánově nespecifické jako je například juvenilní idiopatická artritida nebo systémový lupus erythematoses (SLE). Orgánově specifická AO, jako je AIT, mohou být součástí autoimunitního polyglandulárního syndromu (APS) (8-13). Na tomto místě je třeba zdůraznit, že nepoznaná autoimunitní Addisonova nemoc, která je součástí APS typu 1 a 2, je život ohrožující onemocnění (14). Problematiku APS typu 2 zmiňujeme v práci 1.1.1. a 1.1.2. Málo je známo o familiárním výskytu autoimunitních onemocnění a o koexistenci sdružených AO u jedinců s AIT (15-19).

Jedním ze základních cílů práce 1.1.1. a 1.1.2. bylo analyzovat klinický profil a sdružená autoimunitní onemocnění u pacientů s AIT a v práci 1.1.1. současně zmapovat výskyt karcinomu štítné žlázy u pacientů s AIT ze stejné geografické oblasti s odhadem rizika vzniku v terénu AIT. V průřezové studii jsme retrospektivně analyzovali soubor pacientů s autoimunitními tyreopatiemi ve věkovém rozmezí 3-18 let léčených v endokrinologické poradně Dětské kliniky Fakultní nemocnice v Plzni. Z celkového počtu 246 dětí s autoimunitními tyreopatiemi byla GB přítomna u 15 dětí a AIT u 231 dětí. V souboru dětí s AIT jsme hodnotili demografické údaje, funkci štítné žlázy a pozitivitu specifických autoprotilátek proti štítné žláze v době stanovení diagnózy AIT, ultrasonografické vyšetření štítné žlázy, výskyt sdružených AO, AO u prvostupňových příbuzných pacientů a výskyt karcinomu štítné žlázy (TC) v terénu AIT. Do studie byly zařazeny děti s diagnózou AIT stanovenou na podkladě positivity protilátek anti TPO a/nebo anti TG a ultrasonografickém nálezů změněné echostruktury štítné žlázy s hypoechogenicitou a nepravidelnou texturou. Funkce štítné žlázy byla stanovena analýzou hladin TSH (tyreotropní hormon) a fT4 (volný tyroxin). Diagnóza TC byla založena na aspirační biopsii tenkou jehlou FNAB (fine needle aspiration biopsy) a na histologickém vyšetření uzlů štítné žlázy.

Do studie bylo zahrnuto 231 pacientů s AIT včetně 4 pacientek s Turnerovým syndromem. 98% jedinců ve studii bylo českého původu. V souboru jednoznačně převažovalo postižení ženského pohlaví (77%), poměr mužského a ženského pohlaví byl 1:3,5. Věkové rozložení souboru pacientů s AIT v době stanovení diagnózy: 79 dětí (34%) bylo mladších 10

let, z nich 14 dětí (6%) bylo mladších 6 let; 152 dětí (66%) bylo ve věku 11-18 let (puberta a adolescence). 137 pacientů mělo v době stanovení diagnózy AIT hypotyreózu (59,3%), 91 pacientů (39,4%) mělo normální funkci štítné žlázy a 3 pacienti (1,3%) měli přechodnou tyreotoxickou fázi s přechodem do hypotyreózy (hashitoxikóza). 72 pacientů (52,6%) s hypofunkcí štítné žlázy mělo subklinickou hypofunkci s hladinou TSH 4,2-10 mIU/l (norma 0,3-4) a 65 pacientů (47,4%) mělo klinické známky hypotyreózy, z nich 30 dětí (46%) mělo těžkou hypotyreózu s TSH > 50 mIU/l. 5 dětí s těžkou hypotyreózou mělo atrofickou tyreoiditidu s negativními blokuujícími anti rTSH. 140 pacientů (60,6%) mělo v době diagnózy AIT jak pozitivitu anti TPO, tak anti TG protilátek. U 47 dětí (20,3%) byla pozitivita pouze anti TG a u 36 dětí (15,6%) pouze anti TPO protilátek. 8 pacientů (3,5%) mělo autoprotilátky proti štítné žláze negativní.

Současný výskyt autoimunitních onemocnění u pacientů s AIT a u prvostupňových příbuzných. V analyzované skupině 231 dětí s AIT mělo 56 dětí (24,2%) pozitivní alergickou anamnézu, z nichž většina měla polyvalentní alergii (95%). AO u rodičů, prarodičů nebo sourozenců v naší analyzované skupině 231 dětí s AIT se vyskytovalo u 103 dětí (44,6%). Pouze ve třech případech (1,3%) bylo AO u rodiče nebo prarodiče mužského pohlaví. V 74 případech (71,8%) se v rodinách jednalo o AIT, v 16 případech (15,5%) o GB a ve 13 případech (12,7%) o SLE, revmatoidní artritidu, celiakii, diabetes mellitus 1. typu (T1DM) a vitiligo. V analyzované skupině 231 dětí s AIT bylo 17 pacientů (7,4%), kteří měli sourozence s AO. U sourozenců se také nejčastěji jednalo o AIT. Celkem 35 (15,2%) pacientů (68% žen) ve skupině 231 dětí s AIT mělo v anamnéze 1 nebo více přidružených AO (tabulka 1). T1DM byl nejčastějším komorbidním onemocněním u 19 (8,5%) pacientů s AIT. Jeden pacient s T1DM měl diagnostikován APS typu 2. V 5,5% případů bylo primárně diagnostikováno jiné AO i neendokrinních orgánů a diagnóza AIT již s hypofunkcí štítné žlázy byla stanovena s odstupem několika let.

Současný výskyt AIT a karcinomu štítné žlázy v analyzované skupině pacientů s AIT. Během 7letého období naší studie jsme diagnostikovali TC u 16 pacientů. V 15 případech (94%) se jednalo o papilární karcinom štítné žlázy (PTC) a v 1 případě (6%) o folikulární karcinom. Ve skupině převažovalo u 13 pacientů postižení ženského pohlaví (81%). Průměrný věk souboru byl 13,5 roku, s rozmezím 10-18 let. 11 pacientů s PTC (69%) mělo současně AIT. V této skupině byla v 6 případech diagnóza PTC stanovena v průběhu pravidelného USG sledování pacientů s AIT (u 2 pacientů se jednalo o papilární mikrokarcinom) a v 5 případech byla diagnóza PTC potvrzena současně s diagnózou AIT. V souboru 16 dětí s TC byly metastázy v době stanovení diagnózy přítomny u 9 pacientů

(56%). 8 z těchto 9 pacientů (89%) mělo současně AIT. Jednalo se o metastázy v krčních uzlinách, u 2 pacientů v mediastinálních uzlinách, 2 pacienti měli metastázy ve 2. laloku štítné žlázy a 1 pacient měl plicní metastázy. Extrakapsulární invaze PTC byla přítomna u 7 ze 16 pacientů (44%), 6 (86%) z těchto 7 pacientů byli pacienti s AIT. Celkem 4 pacienti v souboru měli papilární mikrokarcinom.

Závěry studie 1.1.1., 1.1.2 a výstupy pro klinickou praxi můžeme shrnout následujícím způsobem. Jedná se o komplexní studii a podle dostupných údajů o první českou studii analyzující klinický profil, sdružená AO, familiární výskyt AO a výskyt TC v souboru pediatrických pacientů s AIT. Naše pozorování a literární údaje ukazují na častější výskyt AIT u ženského pohlaví. Tato skutečnost byla také potvrzena analýzou rodinné anamnézy ve skupině pacientů s AIT, kde pouze 1,3% rodičů/prarodičů mužského pohlaví trpělo AO. Studie ukázala, že nejčastějším věkem manifestace AIT je puberta a adolescence (věk 11-18 let v době diagnózy byl 66%). Na druhé straně se AIT může manifestovat i u velmi malých a předškolních dětí. Tato skutečnost by neměla být podceňována. Studie dále ukázala, že u dětí s AIT jsou anti TPO a anti TG protilátky současně přítomny u většiny pacientů (v našem souboru 60,6%), ale negativita těchto autoprotilátek diagnózu AIT nevylučuje (3,5%). Blokující anti rTSH, které mohou vést k přechodné vrozené hypotyreóze u novorozence, se vyskytují u 18% dětí a dospívajících s těžkou hypotyreózou. Naše klinické zkušenosti ukazují důležitost vyšetřování blokujících anti rTSH protilátek, zvláště u žen s atrofickou formou AIT v těhotenství. Pozitivita těchto protilátek predikuje možnost zablokování štítné žlázy u plodu s rozvojem přechodné formy kongenitální hypotyreózy. Diagnóza může být u novorozence potvrzena stanovením TSH v pupečnickové krvi a přechodná terapie levothyroxinem zahájena před výsledkem screeningu kongenitální hypotyreózy. Tyto ženy musí mít adekvátní hormonální substituční terapii levothyroxinem po celou dobu gravidity pro trvalou závislost plodu na transplacentárním přenosu tyroxinu k zajištění fyziologického vývoje plodu. 24% pacientů s AIT mělo pozitivní alergickou anamnézu, což dokládá genetickou dispozici k imunopatologickým reakcím u těchto jedinců. V souboru pacientů s AIT jsme potvrdili vysoký výskyt AO u rodičů a/nebo prarodičů (44,6%), což potvrzuje genetickou dispozici k autoimunitní imunopatologické reakci v těchto postižených rodinách. Nejčastější AO byla také AIT s prevalencí 72%, prevalence GB byla 15,5%. Prevalence AO u sourozenců našich pacientů s AIT byla 7,4%, také s predominancí AIT. Na podkladě těchto zjištění se domníváme, že by měl být zvažován u prvostupňových příbuzných jedinců s AIT screening možného vývoje AIT. V době stanovení diagnózy AIT mělo 59% dětí již hypofunkci štítné žlázy, ve 46% byla přítomna těžká nekompenzovaná primární hypotyreóza s myxedémem,

bradykardií, hypotenzí a růstovou retardací. V několika případech se jednalo o děti z rodin s genetickou dispozicí k AO. Otázkou proto je preventivní sledování vývoje AIT a funkce štítné žlázy u dětí v takto disponovaných rodinách s výskytem autoimunitních onemocnění. Pozdní diagnóza těžké primární hypotyreózy může vést k trvalému postižení růstu a vývoje dítěte. Důležitou otázkou, která zatím v České republice nebyla řešena na velkém souboru pacientů, je prevalence sdružených AO u dětí s AIT. V naší studii jsme potvrdili, že AIT se může vyskytovat samostatně nebo v koincidenci s jinými systémovými nebo orgánovými AO endokrinních i neendokrinních orgánů. V našem souboru se jednalo nejčastěji o T1DM (15,2%), 1 pacient s T1DM je vedený pod diagnózou APS typu 2. V 6% případů bylo nejprve diagnostikováno neendokrinní autoimunitní onemocnění a diagnóza AIT již s těžkou hypofunkcí štítné žlázy byla stanovena až s odstupem několika let. Doporučujeme vyhledávat AIT u pacientů s jinými endokrinními a neendokrinními AO. Nesmíme zapomínat na život ohrožující autoimunitní Addisonovu nemoc v případě pozdní diagnózy. Existují kontroverzní názory na roli AIT ve vývoji TC. AIT a PTC mají některé společné rizikové faktory, mezi které patří expozice ionizujícímu záření, zvýšený výskyt v oblastech s dostatečným příjmem jódu a častější výskyt u ženského pohlaví. Genetické změny RET/PTC přeskupení, typické pro PTC, byly nalezeny také u AIT. V našem souboru jsme diagnostikovali v průběhu 7letého období TC u 16 pacientů s převahou PTC v 15 případech. Ve shodě s literárními údaji jsme potvrdili převahu postižení u ženského pohlaví (81%). Průměrný věk našeho souboru byl 13,5 roku a nejmladší dítě s PTC a současně s AIT bylo 10leté. 11 pacientů s PTC (69%) mělo současně AIT. Diagnóza PTC u 6 pacientů s AIT byla stanovena na pokladě pravidelné ultrasonografie štítné žlázy, z nich 2 pacienti měli papilární mikrokarcinom. U 5 pacientů byla diagnóza PTC stanovena současně s diagnózou AIT. 56% pacientů analyzovaného souboru mělo metastázy TC a u většiny z nich byla přítomna AIT (89%). Invazivní forma PTC byla přítomna ve 44%, také s převahou jedinců s AIT (86%). Pacienti s papilárním mikrokarcinomem bez přítomných metastáz podstoupili totální tyreoidektomii bez léčby radioaktivním jódem. Naše výsledky potvrzují, že AIT je jedním z rizikových faktorů pro vývoj TC v dětské populaci. V souladu s publikovanými údaji doporučujeme koncept pravidelného ultrasonografického sledování pacientů s AIT jednou ročně z hlediska možného vývoje PTC. Rovněž se domníváme, že časný záchyt zlepšuje významně prognózu onemocnění.

Práce 1.1.3 rozšiřuje klinicko-morfologické spektrum popisované skupiny asociovaných autoimunitních chorob a potvrzuje kombinaci neobvyklé příčiny poruchy růstu způsobenou celiakií, ulcerózní kolitidou (UC) a AIT. Podle našich znalostí současný výskyt

těchto chorob nebyl dosud v dětském věku publikován. Celiakie je multifaktoriální onemocnění, na jehož rozvoji se uplatňují faktory genetické, imunologické a vlivy prostředí. Celiakie je vyvolána požitím glutenu u predisponovaných jedinců, ale všechny patogenetické mechanismy, vedoucí k poškození sliznice tenkého střeva, nejsou dosud detailně objasněny. Významnou roli mohou hrát trvale zvýšené populace gama/delta T-lymfocytů v epitelu střeva pacientů s celiakií (20,21). Glutenové peptidy jsou prezentovány specifickými antigenprezentujícími buňkami obsahujícími HLA alely II. třídy. Touto cestou dochází k iniciaci imunitní odpovědi převážně v pojivové tkáni lamina propria. tTG, která byla identifikována jako vysoce specifický endomyziální autoantigen, je uvolňována v průběhu zánětlivého slizničního poškození. Tento mechanismus dále potencuje prezentaci antigenu prostřednictvím HLA-DQ2 a HLA-DQ8 po deamidaci glutenových peptidů. Výsledkem je aktivace T-buněk v lamina propria a změny ve sliznici tenkého střeva (22). Diagnóza celiakie je stanovena v souladu s kritérii ESPGHAN (23). Klinická manifestace celiakie se výrazně liší v závislosti na věku pacienta, trvání, rozsahu postižení tenkého střeva a přítomnosti extradigestivních projevů. Je dobře známo, že pokud se choroba projeví u starších dětí, mohou být nejčastějším symptomem opakující se bolesti břicha, naopak těžký průjem bývá vzácný. Dále se celiakie může projevit poruchou růstu bez gastrointestinální nebo jiné endokrinní symptomatologie. Celiakie může být rovněž monosymptomatická a projevovat se pouze jako sideropenická anémie (24). Současný model patogeneze ISZ předpokládá trvalou stimulaci slizniční imunity intraluminálními antigeny (mikrobiální, potravinové) a abnormality v imunoregulaci, které mohou hrát primární roli v rozvoji chronického slizničního zánětu. V případě ISZ nejsou intraluminální antigeny, na rozdíl od celiakie, přesně známy. Při destrukci tkáně se uplatňuje kaskáda různých mediátorů zánětu (cytokiny, reaktivní kyslíkové metabolity, růstové faktory) a většina současných léčebných postupů je zaměřena tímto směrem (25). Zdá se, že klíčovou úlohu u chronických střevních zánětů hraje aktivace makrofágů. Buněčná imunita je u UC ve srovnání s Crohnovou chorobou méně významná. Aktivované T-lymfocyty se v zánětlivé sliznici vyskytují řídce (26). Některé studie předpokládají, že UC by mohla být způsobena IgG zprostředkovaným autoimunitním procesem v mukóze (27,28). Současné výsledky potvrzují u dětí s UC, ve srovnání s Crohnovou chorobou a kontrolami, signifikantně vyšší výskyt protilátek proti pohárkovým buňkám (29). Vyšší pravděpodobnost výskytu celiakie je u příbuzných v první linii a při selektivní IgA deficienci (30). HLA DQ2 také velmi zvyšuje pravděpodobnost celiakie. Celiakie může být asociována s různými chorobami (31). Asociované choroby zahrnují diabetes mellitus 1. typu (32), AIT a autoimunitní hepatitidu (33-35). V poslední době byla

popsána neobvyklá asociace celiakie, systémového lupus erythematoses, Hashimotovy tyreoiditidy a syndromu Noonanové (36). Turnerův syndrom, který je charakterizovaný malým vzrůstem, je rovněž spojen s autoimunitními poruchami jako AIT a celiakie (37). Naše pacientka se závažnou poruchou růstu netrpěla Turnerovým syndromem, ale měla AIT, která byla diagnostikována na základě zvýšené hladiny protilátek anti TPO a sonografického nálezu. Celiakie byla rovněž popsána u pacientů s  $\beta$ -thalasémií major (38), revmatoidní artritidou (39) a Downovým syndromem (40). U dětí s celiakií se vzácně vyskytuje i lymfocytární gastritida (41). Tato forma gastritidy však nebyla v našem případě zjištěna. Exokrinní insuficience pankreatu, spojená s celiakií, se po zavedení bezlepkové výživy normalizuje (42). Sekretorická funkce pankreatu byla v našem případě také normální. Při celiakii může být zaznamenáno přechodné izolované zvýšení aktivity transamináz (43). Bylo rovněž popsáno spojení s neurologickými odchylkami (autismus, epilepsie) (44) nebo mikrocefalií (45). V literatuře je pouze několik případů spojení mezi celiakií a UC u dospělých. Jsou popsány asociace primární sklerozující cholangitidy, UC a celiakie (46, 47, 48). Tři studie prezentují pacienty s celiakií a UC a také jednoho pacienta s Crohnovou chorobou (49-51). Casella a kol. uveřejnili spojení mezi UC, celiakií, glomerulonefritidou, hlubokou žilní trombózou a heterozygotní formou Leidenské mutace V. faktoru (52). V další studii je popsána koexistence dermatitis herpetiformis, celiakie a UC (53). Day a kol. prezentovali dítě s celiakií a UC (54). Sood a kol. popsali 30-ti letého muže a 16-ti letého chlapce s manifestací celiakie, u kterých se postupně rozvinula UC (55). Z epidemiologické studie, kterou publikoval Shah a kol., vyplynulo, že riziko UC je asi 5x vyšší u příbuzných pacientů v první linii oproti běžné populaci (56). Současná asociace celiakie s UC a AIT v dětské populaci dosud nebyla popsána. Pravděpodobnost spojení UC, AIT a celiakie zatím není možno jednoznačně odhadnout, ale současný výskyt spolu s AIT se zdá velmi nezvyklý a vzácný. Společný jmenovatel tohoto spojení není zatím znám, ale autoimunitní podklad je pravděpodobný. Pacienti s celiakií mají vysoké riziko výskytu autoimunitních chorob. Celiakie je silně spojena s HLA DQ2 a DQ8 haplotypem, který by mohl vysvětlit potenciální riziko pacientů k různým autoimunitním onemocněním (57). Dlouhotrvající neléčená celiakie, obzvláště tichá forma, predisponuje k autoimunitním chorobám (58). Kromě toho neléčení pacienti s celiakií mají vyšší výskyt orgánově specifických protilátek. Ve studii pacientů s celiakií Ventura a kol. byla prevalence diabetu a protilátek souvisejících se štítnou žlázou 11,1% respektive 14,4% (59). Da Rosa Utiyama a kol. také poukázali na rozdílné protilátky u pacientů s celiakií a jejich příbuzných (60). I v našem sdělení je patrná tendence k autoimunitním reakcím. Z detailních laboratorních testů je na základě společného výskytu



autoprotilátek patrná tendence k autoimunitním reakcím jak orgánově specifického tak nespecifického charakteru. Na základě současných znalostí a našich zjištění je možno považovat za společný jmenovatel autoimunitní mechanizmy v rozvoji asociovaných chorob endokrinního i non endokrinního původu.

**Tabulka 1**  
**Přidružená autoimunitní onemocnění v souboru 231 pacientů s chronickou lymfocytární tyreoiditidou**

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

## **1.2. Posouzení imunologické reaktivity pacientů s chronickou lymfocytární tyreoiditidou k antigenům *Helicobacter pylori*; epidemiologie a symptomatologie infekce *Helicobacter pylori***

(komentář 3 publikací)

### **1.2.1 Reactivity to *Helicobacter pylori* antigens in patients suffering from thyroid gland autoimmunity**

Stechova K, Pomahacova R, Hrabak J, Durilova M, Sykora J, Chudoba D, Stavikova V, Flajšmanova K, Varvarovska J.

*J Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2009 Sep;117(8): 423-31. DOI: 10.1055/s-0029-1214385. Epub 2009 May 26.

### **1.2.2 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**

Sýkora J, Siala K, Varvařovská J, Pazdiora, P, Huml, M, Pomahačová R.

*Helicobacter*, 2009 Aug; 14(4): 286-297. DOI: 10.1111/j.1523-5378.2009.00689.

### **1.2.3 Paediatric Rome III criteria-related abdominal pain is associated with *Helicobacter pylori* and not with calprotectin**

Sýkora J, Huml, M, Siala K, Pomahačová R, Jehlička P, Liška J, Kuntscherová J, Schwarz J.

*J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2016 Oct; 63(4): 417-422.

DOI:10.1097/MPG.0000000000001172.

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) je hlavní žaludeční patogen, který způsobuje chronickou aktivní gastritidu, gastroduodenální vředy a 2 druhy žaludečních malignit, adenokarcinom a MALT lymfom (61). Tato bakterie je neinvazivní, kolonizuje žaludeční sliznici, zůstává v povrchovém hlenu a neproniká do hlubších vrstev sliznice (62). Stupeň neutrofilní infiltrace dobře koreluje s tíží histopatologických změn v žaludeční sliznici (63). Neutrofilie jsou hlavním zdrojem fekálního kalprotektinu uvolňujícího se během zánětu v gastrointestinálním traktu (64). Data o koncentraci kalprotektinu ve stolici a jeho vztahu k infekci *H. pylori*, žaludečním histologickým změnám a klinickým symptomům včetně funkčních recidivujících bolestí břicha (Rome III) nejsou dostatečné. 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 až k apoptóze epitelálních buněk žaludeční sliznice (65). V žaludeční sliznici byla zjištěna

převaha Th1 lymfocytů s produkcí Th1 cytokinů podporující gastritidu (66). 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 (67). Dalším faktorem poškození epitelálních buněk žaludeční sliznice jsou volné kyslíkové nebo dusíkaté radikály vytvářené aktivovanými neutrofily. Systémová imunitní odpověď hostitele zahrnuje produkci řady chemokinů, cytokinů a stimulaci exprese adhezivních molekul, což by mohlo přispět k rozvoji onemocnění s extragastrointestinální lokalizací. Ze zvířecích modelů je známo, že akutní infekce *H. pylori* je charakteristická spíše Th1 odpovědí, zatímco T lymfocyty v žaludeční sliznici v průběhu chronické infekce produkují jak Th1, tak Th2 cytokiny. Možná role infekce *H. pylori* v iniciaci klinických symptomů a rozvoje autoimunity není dosud spolehlivě objasněna. Nejsou jednotné názory na vztah autoimunitní tyreoiditidy a současné infekce *H. pylori*. Někteří jsou pro příčinnou souvislost mezi infekcí *H. pylori* a autoimunitní tyreoiditidou, někteří jsou proti. 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. 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 (LPS). *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 (68). 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 epitelálních buňkách štítné žlázy a pankreatu.

Studie 1.2.1 popisuje, v literatuře dosud nestudovanou, imunologickou reaktivitu u dětských pacientů s juvenilní lymfocytární tyreoiditidou (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 (lipopolysacharidem) metodou proteinové microarray. Antigeny pro stimulaci byly připraveny z 8 náhodně vybraných kmenů izolovaných od pacientů z oblasti Plzeňského kraje. Bylo vyšetřeno 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). Stejným testům byly podrobeny krevní mononukleární buňky odebrané kontrolní skupině 40 zdravých dívek. 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). 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 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.

Závěry studie 1.2.1 jsou souhrnně uvedeny pro přehlednost v Grafu 1-4 na konci této kapitoly. Ve skupině Th1 cytokinů (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\beta$ ) jsme zjistili statisticky významné zvýšení produkce IFN- $\gamma$  po specifické stimulaci 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*). Ve skupině Th2 cytokinů (IL-4, IL-5, IL-13) zdravé kontroly *H. pylori* negativní reagovaly jak 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. Ve skupině Th3 cytokinů (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). Ve skupině prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) jsme zjistili zajímavé odchylky, 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 ( $p=0.015$ ). 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 ( $p=0.007$ ). Při hodnocení chemokinové reakce po stimulaci lyzátem *H. pylori* - chemokiny (GRO, GRO- $\alpha$ , IL-8, MCP-1,-2,-3, MIG, RANTES) 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 ( $p=0.004$ )]. U chemokinové 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 ( $p=0.017$ )]. Při hodnocení růstových faktorů a dalších cytokinů (G-CSF, GM-CSF, IL-3,-7,-15) při 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. Při reakci 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. Výsledek proteinové microarray byl korelován na věk pacientů, hormonální funkce a autoprotiřátky 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 autoprotiřátky, stejně tak hladina TSH a hladiny dalších hormonů štítné žlázy nevykazovaly vliv na výsledky studie.

Na základě výsledků studie 1.2.1. se imunologická reaktivita k lyzátu *H. pylori* a LPS 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*.

Studie 1.2.1. tedy potvrdila významný vliv infekce *H. pylori* na imunokompetentní buňky, a to zejména v případě jedinců s autoimunitní dispozicí a tudíž přítomnou imunologickou dysbalancí a představila doposud největší sestavu spektra cytokinů a chemokinů u JLT asociovanou s infekcí *H.pylori*. Prokázala, že 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 funkce. Nebyli jsme schopni analyzovat vliv pohlaví na výsledky, protože do studie bylo zařazeno pouze ženské pohlaví. Toto vyplývá z vyšší frekvence výskytu autoimunitní tyreoiditidy u ženského pohlaví, takže jsme neměli možnost získat reprezentativní mužskou kohortu s JLT. Nezjistili 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, IL-10 a IL-15, ale toto pozorování nemůže být vysvětleno odlišným trváním nemoci nebo terapií, protože testování pacienti se v těchto aspektech neodlišovali. Pro malý počet pacientů s atrofickou formou JLT jsme nemohli porovnat odlišné formy tyreoiditidy.

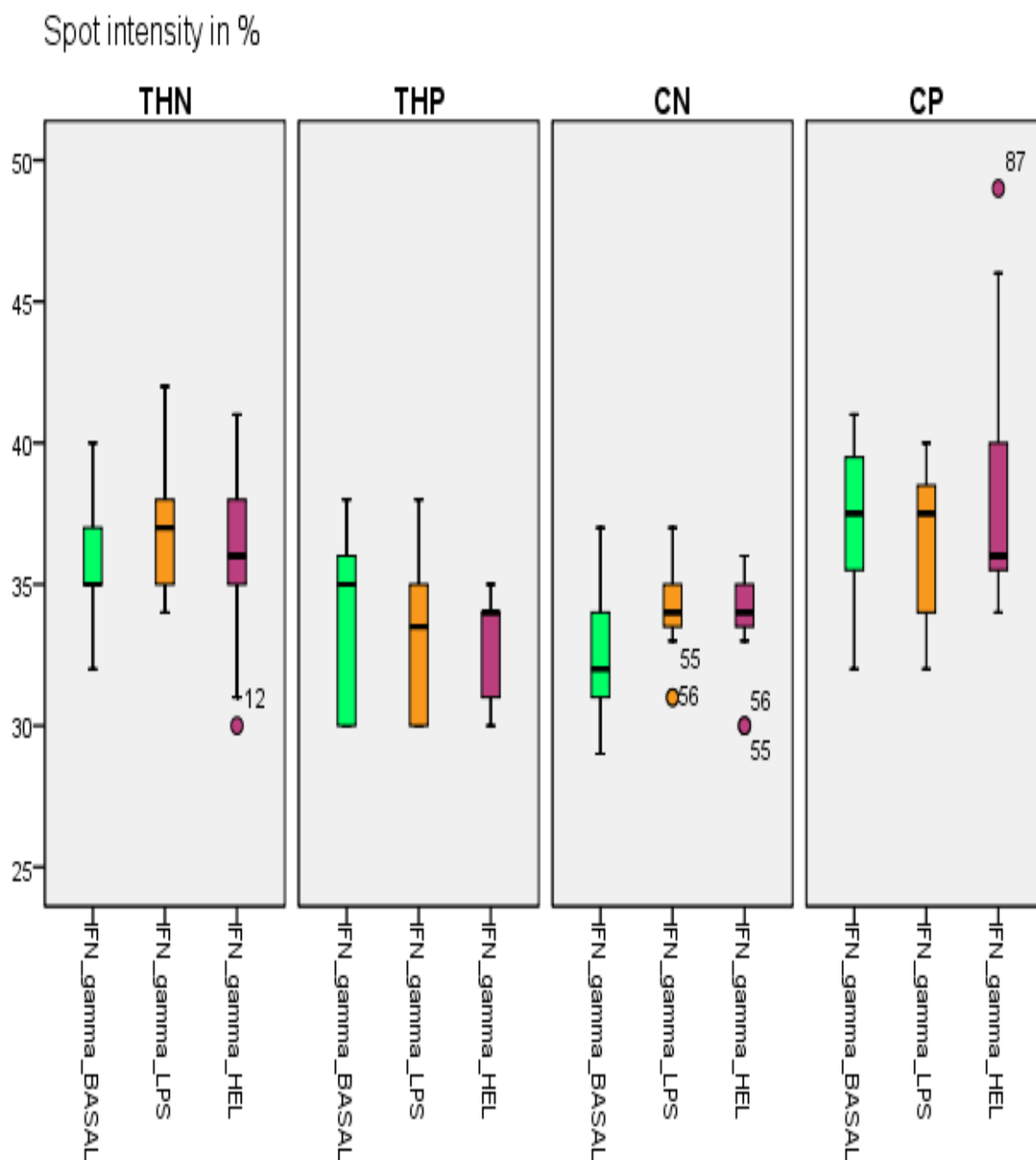
Předmětem studie 1.2.2 bylo dále vyšetřit výskyt infekce *H. pylori* v asymptomatické dětské populaci českých dětí a zjistit rizikové faktory asociované s touto infekcí, protože ačkoliv tato infekce je většinou asymptomatická, může vyvolat chronickou aktivní gastritidu, může spouštět autoimunitní gastritidu a/nebo další autoimunitní nemoci, což jsme také prokázali ve studii 1.2.1. Domníváme se, že je třeba rozlišovat mezi infekcí *H. pylori* a chorobami asociovanými s touto infekcí a tyto údaje je také třeba hodnotit v kontextu geografického regionu. Studie byla prospektivní, průřezová, populačně založená, provedená v Plzeňském kraji na vzorku 1545 dětí (0-15 roků, 49% chlapců). Aktivní infekce byla stanovena monoklonálním testem (ELISA) a současně byly hodnoceny socioekonomické vlivy. Podle této studie, která se jako první zabývala epidemiologickou situací za pomoci antigenu *H. pylori* stanoveného monoklonálními protilátkami ve stolici s vysokou senzitivitou a specifitou (> 90%) ve střední Evropě, je zřejmé, že výskyt 7,1% dětí (5,8% ve všeobecné populaci mimo kolektivní zařízení), byl zdaleka nejnižší v popsané literatuře a srovnatelný se západními státy. Pozitivní asociace byla prokázána s věkem, avšak ne

s pohlavím. Nezávislé rizikové faktory asociované s touto infekcí v naší pediatrické populaci bylo množství dětí v rodině (OR 4.26; CI: 1.91-9.80), nedostatek vzdělání u otce (OR 0.23; CI: 0.18-0.64) a děti v zařízeních kolektivní péče, hlavně dětské domovy (OR 6.33; CI 2.25-26,50). Závěry naší studie jsou dle našeho mínění důležité pro klinickou praxi a společenské intervence. Ukázali jsme na této velké kohortě dětí, že výskyt této infekce patří mezi nejnižší v Evropě a socio-ekonomicky znevýhodněné děti mají bohužel stále vyšší riziko infekce této potenciálně preventibilní infekce v regionu s nízkou prevalencí.

Studie 1.2.3 rozšiřuje klinicko- morfológické spektrum popisované infekce *H.pylori* a ukazuje, že se může podílet na rozvoji dalších chorob a klinických symptomů a doplňuje a rozšiřuje závěry studie 1.2.1. Prokázali jsme, že infekce *H. pylori* je významně asociována s funkčními bolestmi břicha dle Rome III kritérií (69) obzvláště se jedná o funkční dyspepsii ale ne s dalšími formami, současně jsou přítomny zánětlivé změny v žaludeční sliznici a pacienti s těmito změnami měli signifikantně vyšší výskyt infekce *H.pylori*. Na druhé straně stanovení kalprotektinu ve stolici nemělo žádný dopad na diagnostiku funkčních bolestí břicha, infekce *H. pylori* nebo gastritidy. Máme za to, že naše výsledky mohou mít širší dopady směrem k patogenezi chorob spojených s infekcí *H. pylori* a revizi klasifikace funkčních bolestí břicha s nutností dalších intervenčních studií zaměřených na vztah mezi infekcí, rozvojem klinických symptomů a autoimunitních chorob.



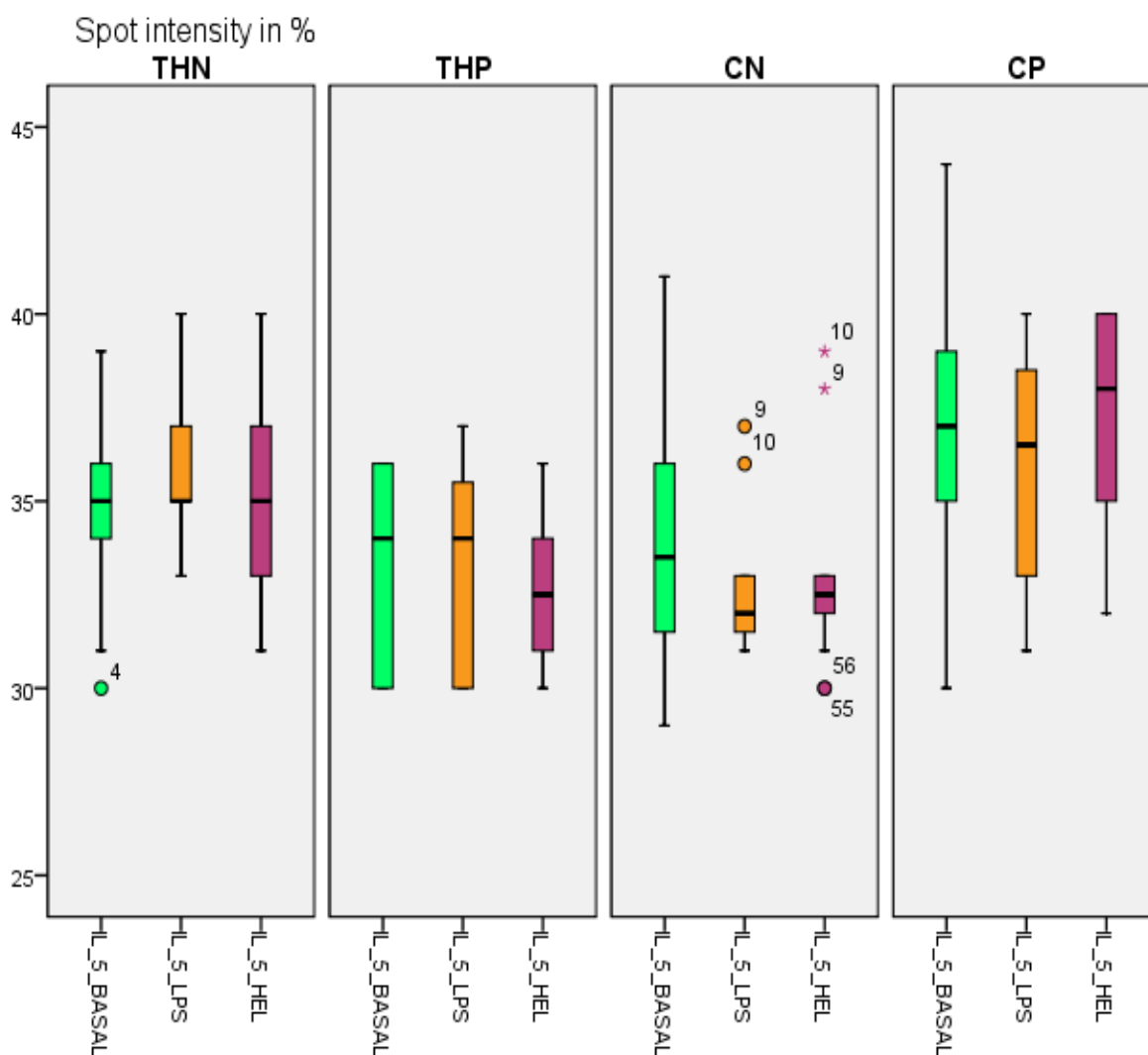
**Graf č. 1** Signifikantní zvýšení produkce IFN- $\gamma$  po stimulaci LPS a lyzátem *H. pylori* u skupiny negativních kontrol



**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

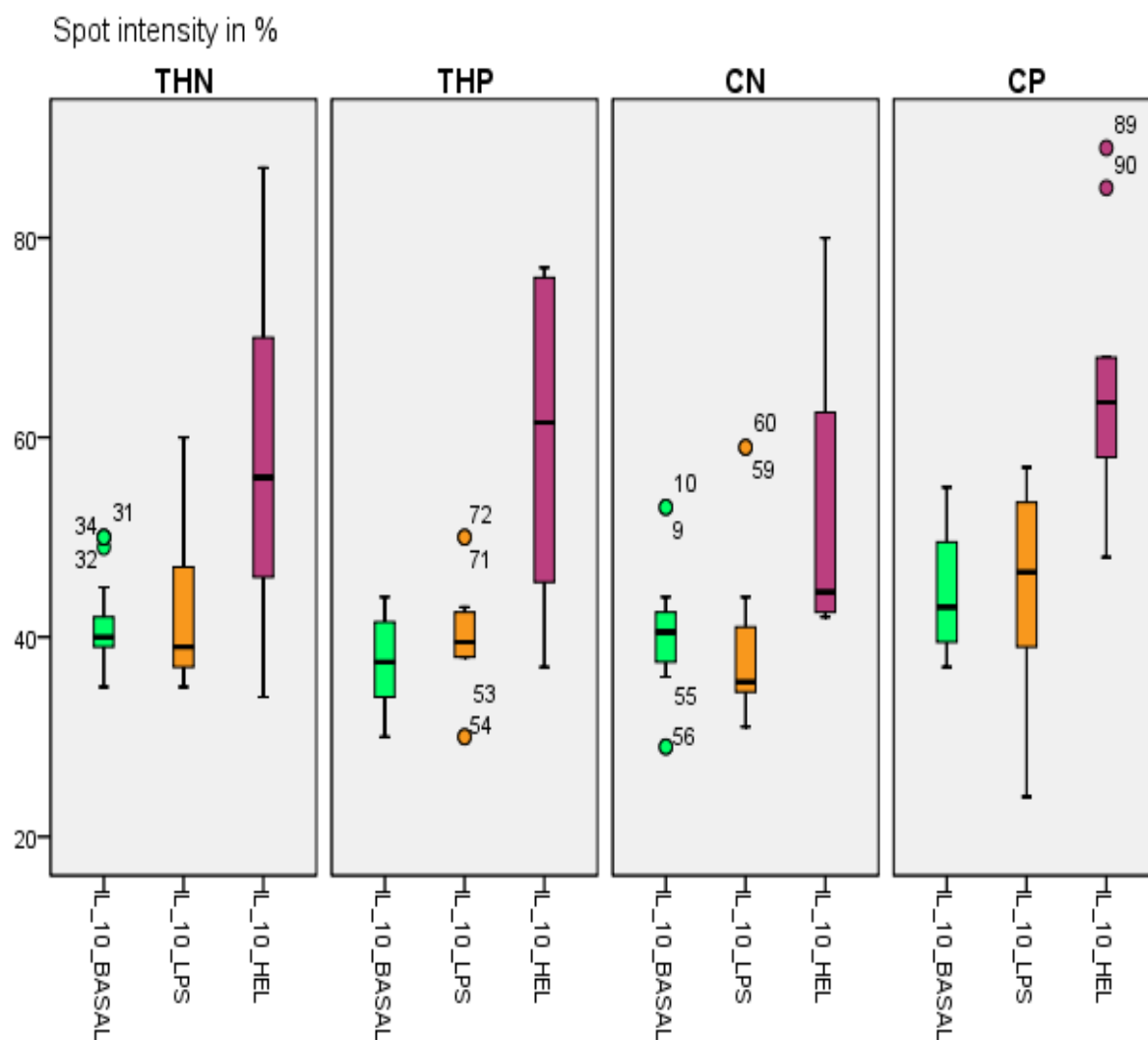
**Graf č. 2** Signifikantní snížení produkce IL-5 po stimulaci LPS a lyzátem *H. pylori* u skupiny negativních kontrol



**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

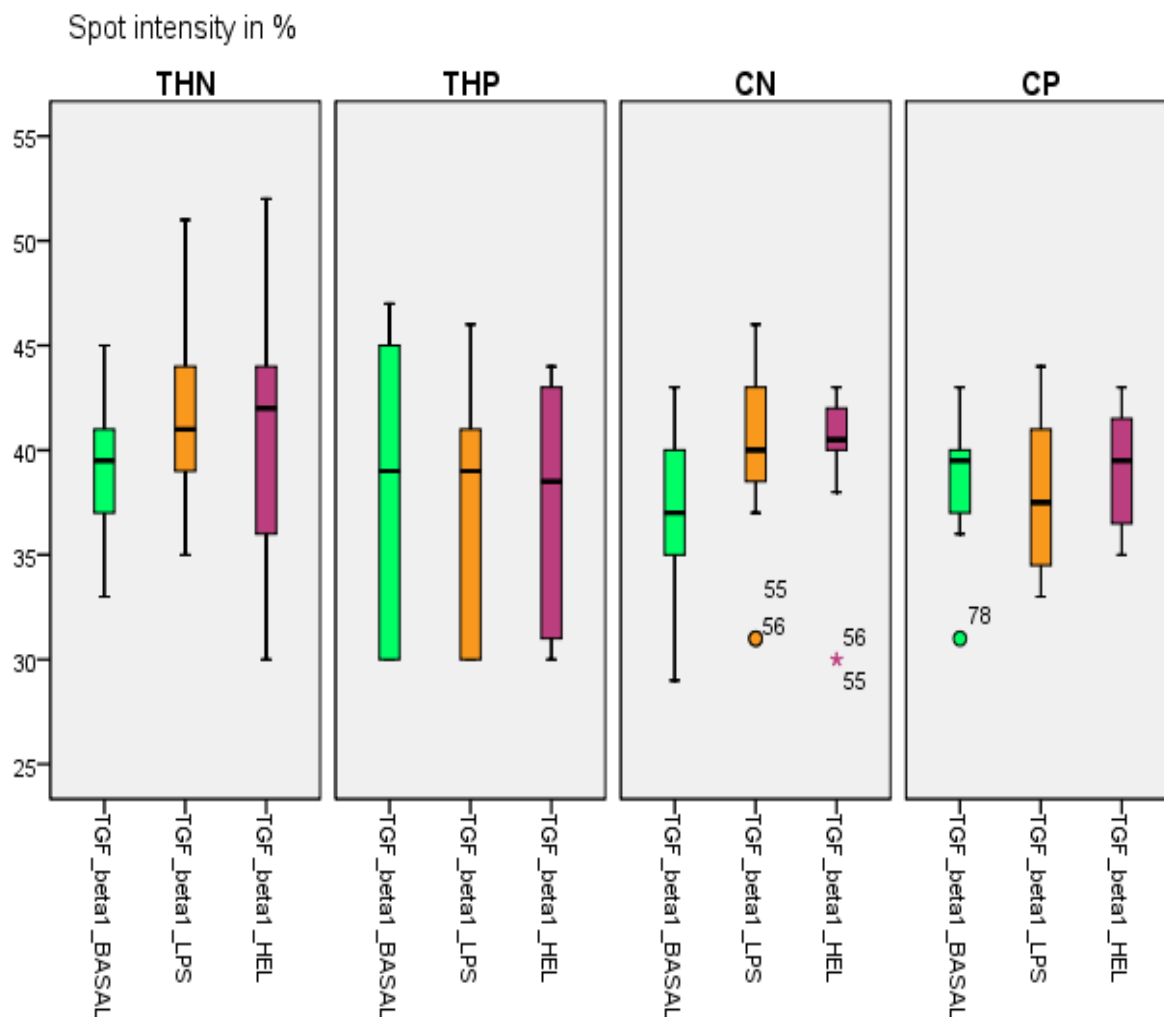
**Graf 3A** Signifikantní snížení produkce IL-10 po stimulaci LPS u skupiny negativních kontrol



**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

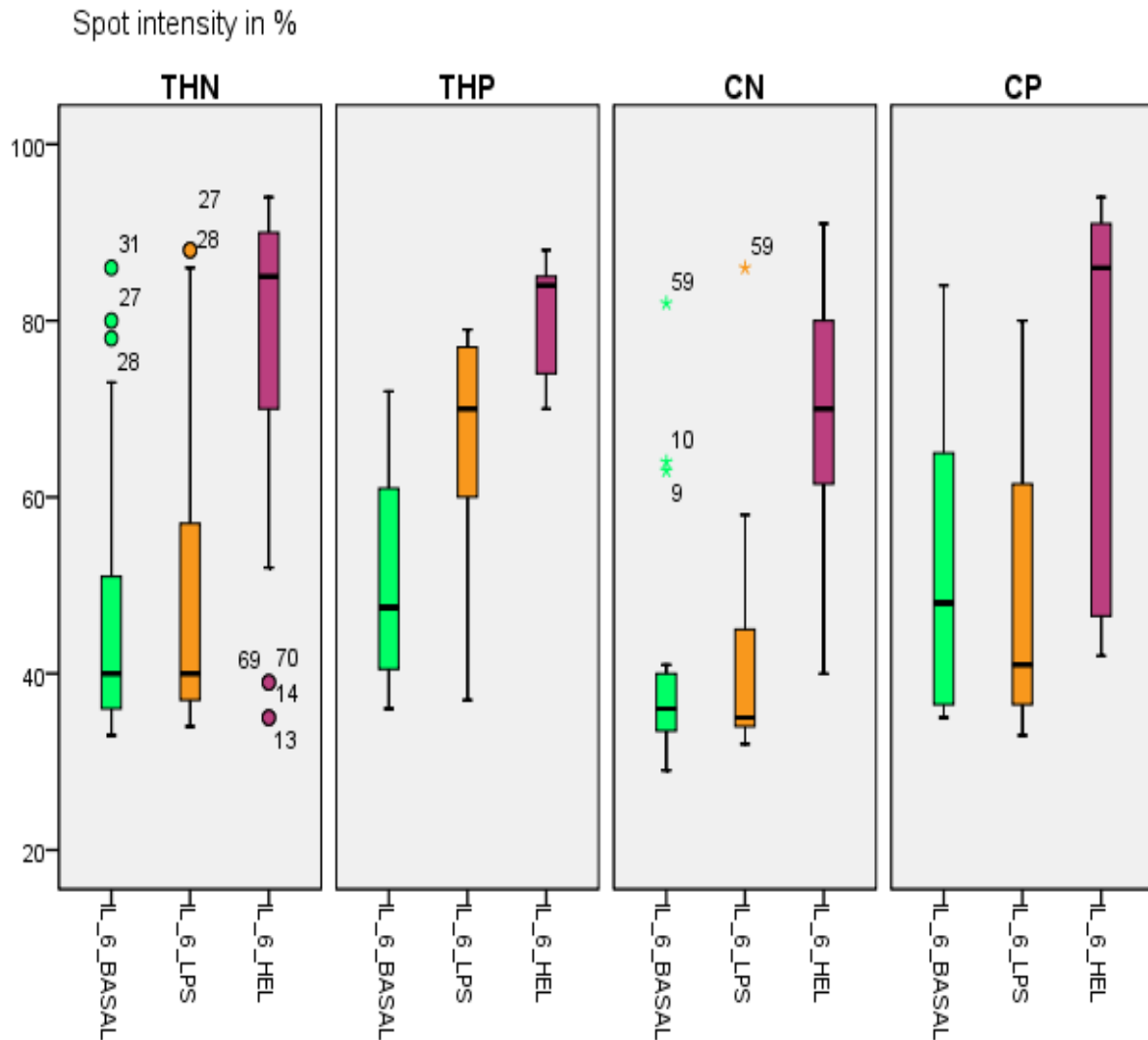
**Graf 3B** Signifikantní zvýšení TGF-β 1 produkce po LPS stimulaci u skupiny negativních kontrol a THN (pacienti JLT *H. pylori* negativní)



**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

**Graf č. 4 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

## **2. ČÁST NADLEDVINY**

## **2.1. Vrozená adrenální hyperplazie způsobená defektem 1. kroku steroidogeneze v důsledku mutace *STAR* genu a *CYP11A1* genu; první pacient s mutací v *CYP11A1* genu v České republice**

(komentář 2 publikací)

### **2.1.1. First case report of rare congenital adrenal insufficiency caused by mutations in the *CYP11A1* gene in the Czech Republic**

Pomahačová R, Sýkora J, Zamboryová J, Paterová P, Varvařovská J, Šubrt I, Dort J, Dortová E.

*J Pediatr Endocrinol Metab*, 2016 Jun ; 29(6): 749-52. DOI: 10.1515/jpem-2015-0255.

### **2.1.2. Nové genetické příčiny primární adrenální insuficience**

#### **New genetic causes of primary adrenal insufficiency**

Pomahačová R, Sýkora, J Zamboryová J, Paterová P, Dort J, Dortová E, Šubrt I.

*Čes-slov Pediat*, 2018; 73 (2): 100-103.

Nejčastější formou (95%) kongenitální adrenální hyperplazie (CAH) je celosvětově defekt enzymu 21-hydroxylázy. Mezi nejvzácnější formy patří defekty lokalizované na začátku steroidogeneze v kůře nadledvin vedoucí ke kongenitální lipoidní adrenální hyperplazii (lipoidní CAH) nebo P450scc adrenální insuficienci. U obou klinických jednotek je porucha steroidogeneze přítomna současně v gonádách a u P450scc adrenální insuficience také v placentě. Frekvence lipoidní CAH je mnohem vyšší než P450scc adrenální insuficience. Klinické a hormonální nálezy u lipoidní CAH a P450scc adrenální insuficience jsou prakticky nerozlišitelné (70,71). Lipoidní CAH je způsobena defektem steroidogenního akutního regulačního proteinu (StAR protein), který je nezbytný pro přenos cholesterolu z vnější na vnitřní membránu mitochondrie (72). Mutace v tomto genu byla poprvé popsána v roce 1996. Enzym štěpící postranní řetězec cholesterolu (P450scc) ovlivňuje konverzi cholesterolu na pregnenolon, tedy první krok steroidogeneze. *CYP11A1* gen, který kóduje enzym P450scc je lokalizován na dlouhém raménku 15. chromozomu (15q23-24). Mutace v tomto genu byla poprvé popsána u pacienta s akutní adrenální insuficiencí a s poruchou sexuální diferenciací v roce 2001 (73). V České republice mutace v *CYP11A1* genu dosud nebyla popsána. Nedostatečná steroidogeneze v kůře nadledvin u lipoidní CAH vede ke

zvýšené produkci ACTH (adrenokortikotropní hormon) v hypofýze s akumulací cholesterolu v tukových kapénkách v buňkách kůry nadledvin s jejich následným poškozením. Patofyziologický mechanismus poškození buněk kůry nadledvin v důsledku akumulace cholesterolu může vysvětlit neklasickou formu lipoidní CAH s manifestací adrenální insuficience později v dětství. Stejný problém může postihnout testes a ovaria (74). Leydigovy buňky v testes jsou poškozeny již v průběhu embryogeneze. Folikulární buňky v ovariích zůstávají bez stimulace, a tedy bez poškození, až do puberty. K jejich poškození dochází v pubertě po aktivaci gonadální osy se zahájením produkce steroidních hormonů. Klasické formy lipoidní CAH a P450scc adrenální insuficience jsou charakterizovány těžkou poruchou steroidogeneze v nadledvinách a v gonádách (74). Snížená produkce testosteronu fetálními testes vede k poruše vývoje zevního genitálu u mužského pohlaví. 46,XY novorozenci se rodí vždy s fenotypicky ženským genitálem. Život ohrožující akutní adrenální insuficience se manifestuje časně po narození. U plodů s mutací *CYP11A1* genu je vysoké riziko potratu nebo předčasného porodu, protože enzym P450scc je nezbytný pro steroidogenezi v placentě. Progesteron suprimuje děložní kontraktilitu, pomáhá tak k udržení těhotenství. StAR protein se naopak steroidogeneze v placentě neúčastní, proto plody s mutací *STAR* genu nejsou ohroženy potratem nebo předčasným porodem (73). Poměrně nedávno byly popsány neklasické formy lipoidní CAH (r. 2006) a P450scc adrenální insuficience (r. 2009) s částečnou poruchou funkce StAR proteinu nebo enzymu P450scc (75). Pacienti se manifestují pozdním nástupem primární adrenální insuficience a neúplnou virilizací zevního genitálu u mužského pohlaví (mikropenis, retence testes, hypospadie).

V naší práci 2.1.1. a 2.1.2. popisujeme případ extrémně vzácné příčiny vrozené primární adrenální insuficience. Jedná se o klasickou formu P450scc adrenální insuficience, poprvé popsanou v České republice, způsobenou novou *CYP11A1* missense mutací c.412G>A (p.Gly138Arg) v exonu 2 a frameshift mutací c.508\_509delCT (p.Leu170Valfs\*30) v exonu 3, která rozšiřuje genotypické spektrum *CYP11A1* mutací. Pacientka se narodila z první rizikové gravidity rodičům z nepříbuzenského vztahu. Těhotenství bylo ukončeno sekcí ve 36. týdnu gestace pro opakované krvácení od 3. měsíce gravidity, s porodní hmotností 2600 g a délkou 47 cm. Několik hodin po porodu se rozvinula kardiopulmonální nestabilita s těžkou solnou krizí. Parametry vnitřního prostředí a hormonální nálezy svědčily pro primární adrenální insuficienci s těžkou hyponatremií, hyperkalemií, hypoglykemií, metabolickou acidózou, extrémně nízkou hladinou sérového kortizolu a vysokou hladinou ACTH. Nízká hladina 17-hydroxyprogesteronu a ženský zevní genitál bez známek virilizace vyloučily možnost CAH způsobené defektem enzymu 21-hydroxylázy. Ultrasonografické vyšetření



nadledvin vyloučilo možnost krvácení a hyperplazie kůry nadledvin. Chromozomální vyšetření potvrdilo ženské pohlaví. Po zahájení substituční hormonální terapie glukokortikoidy a mineralokortikoidy s dosolováním NaCl došlo k normalizaci klinického stavu a parametrů vnitřního prostředí. Vyšetření magnetickou rezonancí v 7 letech věku verifikovalo hypoplastickou levou nadledvinu, pravá nadledvina nebyla nalezena. Ve věku 4 roky byly hladiny gonadotropinů fyziologicky prepubertální. Ve věku 12 let jsme provedli, pro nenastupující známky puberty, kontrolní vyšetření gonadální funkce s vývojem hypergonadotropního hypogonadismu s vysokými hladinami LH (luteinizační hormon), FSH (folikuly stimulující hormon) a ultrasonograficky přítomnými hypoplastickými vaječníky. Tento vývoj potvrdil naši původní domněnku o společném bloku steroidogeneze v kůře nadledvin a v gonádách. Mutace v genu kódujícím StAR protein nebyla nalezena. Sekvence *CYP11A1* genu kódujícím enzym P450scc potvrdila dvě mutace v tomto genu. Pacientka je složený heterozygot pro novou *CYP11A1* missense mutaci c.412G>A (p.Gly138Arg) v exonu 2, zděděnou od otce, a *CYP11A1* frameshift mutaci c.508\_509delCT (p.Leu170Valfs\*30) v exonu 3, zděděnou od matky stanovenou pomocí „in silico analýzou“. Genetické vyšetření vyloučilo mutaci v *CYP11A1* genu u mladší sestry. Genetické testování bylo provedeno ve spolupráci s prof. Y. Morelem v Lyonu (Centre de Biologie Est, Service d'Endocrinologie Moléculaire et Maladies rares, Lyon, Francie).

Závěry práce 2.1.1. a 2.1.2. a výstupy pro klinickou praxi. P450scc adrenální insuficience je extrémně vzácná, ale u jedinců s primární adrenální insuficiencí je třeba na ni myslet. Těžké formy lipoidní CAH a P450scc adrenální insuficience jsou život ohrožující onemocnění, pokud nejsou časně diagnostikovány a léčeny. Nesmíme zapomínat, že steroidogeneze probíhá jak v nadledvinách, tak v gonádách. U lipoidní CAH a P450scc adrenální insuficience je v důsledku poruchy prvního kroku steroidogeneze postižena jak syntéza glukokortikoidů a mineralokortikoidů, tak syntéza pohlavních hormonů. U novorozenců s primární adrenální insuficiencí s fenotypicky ženským genitálem by proto mělo být vždy určeno pohlaví dítěte. Lipoidní CAH se vyskytuje především v Japonsku (2. nejčastější enzymatický blok), v Koreji a v Palestině s incidencí 1:300 000 živě narozených dětí. Dosud bylo popsáno 48 mutací u 190 pacientů. P450scc adrenální insuficience byla dosud popsána pouze u 19 pacientů (Japonsko, Korea, Čína, Sýrie, Saudská Arábie, Rusko, Turecko, Fidži, USA- hispánci, Německo, Česká republika), z toho byla klasická forma onemocnění u 10 pacientů. V České republice se tedy jedná o prvního popsaného pacienta. Klasická forma lipoidní CAH a P450scc adrenální insuficience jsou spojené s těžkou poruchou funkce StAR proteinu nebo enzymu P50scc. Naopak neklasické formy onemocnění

u pacientů s neúplnou virilizací zevního genitálu u mužského pohlaví jsou způsobeny částečnou poruchou funkce StAR proteinu nebo enzymu P450<sub>scc</sub> (mikropenis, retence testes, hypospadie) a k rozvoji primární adrenální insuficience dochází později v průběhu dětství. V našem případě se jednalo o klasickou formu P450<sub>scc</sub> adrenální insuficience. Akutní adrenální insuficience nejasné etiologie s kardiopulmonální nestabilitou a solnou krizí se vyvinula několik hodin po porodu. Laboratorní vyšetření potvrdila vysoce elevovanou hladinu ACTH, reninu a téměř nedetekovatelné hladiny adrenálních steroidů. Tyto nálezy byly popsány u všech pacientů s P450<sub>scc</sub> adrenální insuficiencí. Stejně jako u dříve popsaných jedinců s touto diagnózou předpokládáme u naší pacientky velmi nízkou aktivitu enzymu P450<sub>scc</sub> s těžkou poruchou steroidogeneze. Nepřímo pro to také svědčí časná manifestace adrenální insuficience a vývoj gonadální insuficience. Anamnéza opakovaného krvácení od 3. měsíce gravidity s předčasným ukončením těhotenství má vztah ke konečné diagnóze. Plody s mutací v *CYP11A1* genu kódujícím enzym P450<sub>scc</sub> jsou ohroženy potratem nebo předčasným porodem, protože tento enzym je nezbytný pro steroidogenezi v placentě. Plody s mutací v genu kódujícím StAR protein nejsou ohroženy potratem nebo předčasným porodem, protože StAR protein se steroidogeneze v placentě neúčastní. Tento fakt může vysvětlit nižší incidenci P450<sub>scc</sub> adrenální insuficience než lipoidní CAH. U lipoidní CAH je typická hyperplazie kůry nadledvin. Naopak u žádného pacienta s defektem enzymu P450<sub>scc</sub>, včetně naší pacientky, nebyla hyperplazie kůry nadledvin dosud popsána. Klinické a hormonální nálezy jsou u lipoidní CAH a P450<sub>scc</sub> adrenální insuficience prakticky nerozlišitelné. V diagnostice k odlišení obou forem může pomoci radiologické vyšetření, ale z našich zkušeností vyplývá, že k potvrzení diagnózy je nezbytné molekulárně genetické vyšetření.

## **2.2. Cushingův syndrom v dětském věku; příčiny; klinický obraz; diagnostika; léčba**

(komentář 2 publikací)

### **2.2.1. Cushingova nemoc v dětském věku – kazuistika**

#### **The Cushing disease in childhood – a case report**

Pomahačová R, Paterová P, Skalická, E, Lád V.

*Kazuistiky v diabetologii*, 2014, vol. 12, no. 3, p. 32-35.

### **2.2.2. Cushingův syndrom v dětském věku**

Pomahačová R.

*Česko-slovenská pediatrie*, 2015, vol. 70, no. 4, p. 190-192.

Cushingův syndrom (CS) je vzácné onemocnění provázené zvýšenou mortalitou a morbiditou, především kardiovaskulární, proto je nutná včasná diagnóza a etiologicky cílená léčba. Jeho diagnostika a léčba je často velmi obtížná (76). CS rozdělujeme na ACTH (adrenokortikotropní hormon)-independentní formu a ACTH-dependentní formu. Příčinou ACTH-independentní formy CS může být exogenní podávání glukokortikoidů, adrenokortikální tumory (adenom nebo karcinom), primární adrenokortikální hyperplazie (primární pigmentovaná adrenální nodulární nemoc, makronodulární adrenální hyperplazie, McCuneův-Albrightův syndrom). Příčinou ACTH-dependentní formy CS může být ACTH produkující adenom hypofýzy (morbus Cushing) nebo ektopický Cushingův syndrom. Cushingova nemoc (CD) je nejčastější příčinou CS v dospělém věku a u dětí nad 5 let věku s hlavním výskytem v období puberty a adolescence (77). Nejčastější příčinou je ACTH produkující adenom hypofýzy s převahou mikroadenomů. Makroadenomy jsou u dětí vzácné. CD může být součástí MEN-I (mnohočetná endokrinní neoplazie). V prepubertálním období převažuje u CD postižení mužského pohlaví, v pubertě je zastoupení obou pohlaví stejné, v adolescenci a dospělosti pak převažuje postižení u ženského pohlaví. Léčbou první volby je transsfenoidální resekce adenomu hypofýzy s literárně udávanou úspěšností v dospělém věku u mikroadenomů mezi 66-90%, u dětí mezi 45-78%. Za úspěšný operační výkon je považována pooperační ranní kortizolémie < 50 nmol/l. V opačném případě je možná radiční léčba rezidua adenomu stereotaktickým ozářením Leksellovým gama nožem (LGN) s blokováním steroidogeneze v kůře nadledvin do účinku radiace (78). K blokování steroidogeneze lze použít adrenolytickou nebo neuromodulační terapii. Novým lékem je

analog somatostatinu (pasireotid) inhibující sekreci ACTH v buňkách adenomu. Adrenokortikální tumory jsou nejčastější příčinou CS u dětí do 5 let věku. Proti dospělému věku převažují u dětí karcinomy nad adenomy, které se klinicky projevují výraznými příznaky androgenní nadprodukce (79). Ektopický Cushingův syndrom je v dětském věku velmi vzácný. Příčinou jsou u dětí především bronchiální karcinoidy a karcinoidy thymu. Paraneoplastická produkce ACTH může provázet Wilmsův tumor a adrenální neuroblastom. Vzácný McCuneův-Albrightův syndrom jako příčina CS postihuje nejmladší věkové kategorie. V klinickém obraze převažuje u dětí a adolescentů s CS typický cushingoidní habitus (77,79). Mezi hlavní klinické příznaky CS v dětském věku patří progredující obezita; porucha růstu se zpomalením růstového tempa; porucha vývoje pravé centrální izosexuální puberty a klinické známky patologické nadprodukce adrenálních androgenů, které se u dítěte mohou projevit jako předčasná pseudopuberta (izosexuální u mužského pohlaví a heterosexuální u ženského pohlaví) nebo u dívek rozvojem hirsutismu a akné. Mezi další klinické příznaky CS patří měsícovitý obličej, strie, hematomy, atrofie kůže, podkoží a svalů, arteriální hypertenze, porucha sacharidového metabolismu, psychické změny (deprese, porucha spánku), infekce, osteoporóza. U malých dětí s CS dominuje progredující obezita a porucha růstu se zpomalením růstového tempa. Pro diagnózu endogenního hyperkortizolismu svědčí vysoký odpad volného kortizolu v moči za 24 hodin, narušený diurnální rytmus sekrece kortizolu s chyběním fyziologického poklesu noční kortizolémie a nedostatečná supresibilita v hladině kortizolu v séru při dexamethasonovém supresním testu. Při potvrzení endogenního hyperkortizolismu pak hladina ACTH odliší formu CS. Suprimovaná hladina ACTH svědčí pro ACTH-independentní formu CS, zvýšená nebo normální hladina ACTH svědčí pro ACTH-dependentní formu CS (77). U ACTH-independentní formy CS provádíme zobrazovací vyšetření nadledvin a u ACTH-dependentní formy CS zobrazovací vyšetření hypofýzy (80). K potvrzení Cushingovy nemoci a k odlišení od ektopického CS je někdy nutno, před operačním výkonem, provést test s CRH (kortikoliberin) nebo katetrizaci sinus petrosi inferiores s odběry ACTH bazálně a po stimulaci CRH simultánně z petrózních splavů a z periferní krve.

V práci 2.2.1. a 2.2.2. popisujeme případ 13leté dívky s Cushingovou nemocí při ACTH produkujícím mikroadenomu hypofýzy. Prvními příznaky vedoucími k diagnóze onemocnění byly svalová slabost, psychické potíže s depresemi a poruchou spánku. V době stanovení diagnózy byly přítomny pouze iniciační příznaky Cushingova syndromu s vývojem měsícovitého obličeje, hirsutismu při patologické nadprodukci adrenálních androgenů, bez přítomné obezity a bez strií. Nápadná byla slizniční kandidóza jako projev imunosuprese při

hyperkortizolismu a zvýšená tvorba hematomů. Těžká systolicko-diastolická hypertenze byla důsledkem mineralokortikoidního efektu kortizolu při jeho nadprodukci. Supresní vliv hyperkortizolismu na osu hypothalamus-hypofýza-gonády se projevil zástavou vývoje centrální izosexuální puberty. Zpomalení růstového tempa při supresi osy růstový hormon-IGF-I (inzulinu podobný růstový faktor 1) bylo přítomno 2 roky před vývojem klinických symptomů hyperkortizolismu. Laboratorně byla přítomna těžká hypokalémie 2,3 mmol/l a metabolická alkalóza jako důsledek hyperkortizolismu. Vysoký odpad volného kortizolu v moči za 24 hodin a narušený diurnální rytmus sekrece kortizolu s chyběním fyziologického poklesu noční kortizolémie potvrdily endogenní hyperkortizolismus (ranní kortizol v séru v 7.00 hodin 1903 nmol/l při normě 250-600; noční kortizol v séru ve 24 hodin 1260 nmol/l při normě do 50). Vysoká hladina ACTH svědčila pro centrální příčinu CS (ACTH 228,1 pg/ml při normě 10-60). MR mozku se zaměřením na hypofýzu potvrdila Cushingovu nemoc při mikroadenomu hypofýzy. Potvrdili jsme současně steroidní diabetes mellitus. Pacientka podstoupila úspěšnou transsfenoidální resekci mikroadenomu hypofýzy. Po operaci byla izolovaně hypokortikální. Ustoupily symptomy hyperkortizolismu včetně normalizace krevního tlaku a sacharidového metabolismu. Obnovil se růst a vývoj centrální izosexuální puberty. K recidivě onemocnění u pacientky došlo 2 roky po první operaci. Druhý operační výkon nebyl úspěšný, pacientka proto podstoupila ozáření rezidua adenomu LGN. Do účinku ozáření steroidogeneze byla blokována kombinovanou adrenolytickou a neuromodulační terapií (metyrapon, ketokonazol, dopaminergní agonista).

V práci 2.2.1. jsme analyzovali soubor našich tří dětí s CD. Ve dvou případech byl příčinou mikroadenom hypofýzy a v jednom případě makroadenom. Všechny děti byly pubertálního věku, jednalo se o dvě dívky a jednoho chlapce. Plně vyjádřený klinický obraz CS včetně progredující obezity, purpurových strií, měsícovitého obličejce a hirsutismu byl přítomen pouze u jedné pacientky. Fotodokumentace u ní ukázala postupný vývoj cushingoidního habitu poslední 3 roky před stanovením diagnózy. Tato pacientka byla vedena nejprve pod diagnózou prosté obezity. U všech dívek se hyperandrogenní stav při CD projevil vývojem hirsutismu, akné, u chlapce vývojem izosexuální pseudopuberty s růstem penisu a pubarché při prepubertálních testes. Dívky měly zástavu vývoje pravé centrální izosexuální puberty. U všech pacientů byla přítomna růstová porucha se zpomalením růstového tempa. Nejtěžší hypertenzi, hypokalémií, metabolickou alkalózu a diabetes mellitus měla pacientka s iniciálními klinickými příznaky CS uvedená v kazuistickém sdělení, která byla z našich pacientů s CD nejvíce hyperkortikální. Všichni pacienti podstoupili transsfenoidální resekci adenomu hypofýzy. U chlapce, pro nejasný nález mikroadenomu na MR hypofýzy, bylo

nutno provést před výkonem katetrizaci petrózních splavů k potvrzení hypofyzární etiologie hyperkortizolismu. Úspěšný byl až druhý operační zákrok. Po výkonu vyžadoval komplexní hormonální substituční terapii pro panhypopituitarismus a diabetes insipidus centralis. Došlo ke spontánnímu nástupu centrální izosexuální puberty a 3 roky po operaci k obnově funkce adrenální osy s vysazením hydrokortizonu. Zrecidivoval 7 let po operaci. Následně podstoupil dva neúspěšné operační zákroky a je po ozáření LGN. U dívek s mikroadenomem hypofýzy byl první operační výkon úspěšný. Po operaci byly dívky izolovaně hypokortikální. K obnově adrenální funkce došlo za 1-2 roky po operaci. Dívka s plně vyjádřeným obrazem CS v době stanovení diagnózy zůstává v remisi nyní 4 roky. Pacientka, kterou uvádíme v kazuistice, zrecidivovala 2 roky po první operaci.

Závěry práce 2.2.1. a 2.2.2. a výstupy pro klinickou praxi zdůrazňují nutnost myslet na CS v případě náhlého progresivního vývoje obezity s dalšími typickými klinickými symptomy pro dětský věk. Nesmíme zapomínat na postupný vývoj symptomů hyperkortizolismu, kdy pacienta můžeme zachytit v časně fázi onemocnění s chyběním plně vyjádřeného klinického obrazu. U obézního dítěte je třeba hodnotit křivku BMI (body mass index) a současně růstovou křivku. Na rozdíl od prosté obezity je hyperkortizolismus vždy u dítěte provázen zpomalením růstového tempa. Při zpomalení růstového tempa u dítěte nejasné etiologie musíme v diferenciativně diagnostické rozvaze také zvažovat hyperkortizolismus, protože zpomalení růstu může být časným příznakem vývoje endogenního hyperkortizolismu. Víme, že hyperandrogenní stav provází také pozdní formu vrozené adrenální hyperplazie. Na rozdíl od hyperkortizolismu je pro dětský věk ale v tomto případě typické naopak urychlování růstu s akcelerací v růstové křivce. V diagnóze onemocnění nám může také pomoci fotodokumentace zachycující vývoj cushingoidního habitu.

# **3. ČÁST**

## **GONÁDY**

### **3.1. Pohlavní diferenciacce; syndrom úplné androgenní insenzitivity; mutace v genu pro androgenní receptor; genetické, klinické a etické aspekty onemocnění**

(komentář 2 publikací)

#### **3.1.1. Late diagnosis of Complete Androgen Insensitivity Syndrome and Transmission/Carriers of the Disease in a Family with mutation c.2495G>T p.(Arg832Leu) in exon 7 of the androgen receptor gene: genetic, clinical and ethical aspects**

Pomahačová R, Zamboryová J, Paterová P, Křepelová J, Šubrt I, Jaklová R, Vohradská P, Hrdonková E, Sýkora J.

*Biomedical Papers*, October 17, 2018, DOI: 10.5507/bp.2018.067 (Published ahead of print)

#### **3.1.2. Překvapivá diagnóza vzácné endokrinní choroby při vyšetření dítěte pro malý vzrůst**

##### **Surprising diagnosis of a rare endocrine disease when examining a child for short stature**

Pomahačová R, Paterová P, Šubrt I, Jaklová R, Vohradská P, Hrdonková E.

*Pediatric pro praxi*, 2014, vol. 15, no. 4, p. 222-224.

Důležitou roli ve vývoji vnitřního a zevního genitálu u mužského pohlaví hraje testosteron produkovaný fetálními testes a dihydrotestosteron, který vzniká konverzí z testosteronu účinkem enzymu 5 $\alpha$ -reduktázy (81). Předpokladem fyziologické produkce testosteronu ve fetálních testes je správná funkce osy hypothalamus - hypofýza - gonády a enzymů, které se účastní steroidogeneze v gonádách. Pro zprostředkování fyziologického účinku testosteronu a dihydrotestosteronu je nezbytná správná receptorová citlivost tkání (82). Syndrom androgenní insenzitivity (AIS- androgen insensitivity syndrome) je nejčastější příčinou mužského pseudohermafroditismu s incidencí 1:20 000 narozených chlapců. Příčinou je mutace v genu pro androgenní receptor, který je lokalizován na chromosomu X, takže žena může být přenašečkou onemocnění. Je popsáno přes 800 mutací v tomto genu (83,84). Podle stupně virilizace zevního genitálu se AIS dělí do 7 stupňů od minimální, přes neúplnou, až po úplnou androgenní insenzitivitu. U minimální AIS mají pacienti normální mužský genitál, gynekomastii a infertilitu v důsledku azoospermie nebo oligozoospermie. U dalších stupňů neúplné androgenní insenzitivity (PAIS- partial androgen insensitivity syndrome) je různě těžká porucha virilizace zevního genitálu (např. mikropenis,



hypoplastické skrotum, retence testes) (85). U kompletní androgenní insenzitivity (CAIS-complete androgen insensitivity syndrome) se chlapci rodí s fenotypicky ženským zevním genitálem. Fetální testes u CAIS produkují testosteron, ale v důsledku necitlivosti k testosteronu a dihydrotestosteronu dochází k poruše vývoje vnitřního a zevního genitálu u mužského fetu. Produkce AMH (antimüllerický hormon) v Sertoliho buňkách fetálních testes je fyziologická, takže nedojde k vývoji vejcovodů, dělohy a proximální části pochvy z paramezonefrických Müllerových vývodů. Nevyvíjí se nadvarlata, ductus deferens, prostata, semenné vajíčky a zevní mužský genitál. Testes jsou u CAIS lokalizována v pánvi, tříselných kanálech nebo ve velkých labiích. Leydigovy buňky produkují testosteron, ale spermatogeneze je porušena, protože některé její fáze jsou závislé na androgenech (86). Testes jsou dysgenetická s rizikem malignizace v seminom nebo dysgerminom ve 2-5% v dětství a ve 20 % v pubertě. U pacientů s CAIS dochází v dospělosti k vývoji prsů, protože estrogény jsou produkovány v testes a vznikají také aromatizací z testosteronu v periferních tkáních. V důsledku androgenní insenzitivity chybí pacientům axilární a pubické ochlupení, bývají vyšší postavy a mají primární amenoreu, která může vést k diagnóze onemocnění. Jedinci s CAIS jsou vychováni jako ženy, cítí se být ženami, ale nejsou fertilní. Po stanovení diagnózy CAIS se provádí gonadektomie. Pubertu navozujeme estrogény. Hormonální substituční léčba je kontinuální. Gestageny nepodáváme vzhledem k absenci dělohy. Někdy je u žen nutná plastická úprava délky pochvy. Za nedílnou součást léčby považujeme psychologickou podporu pacientky a celé rodiny.

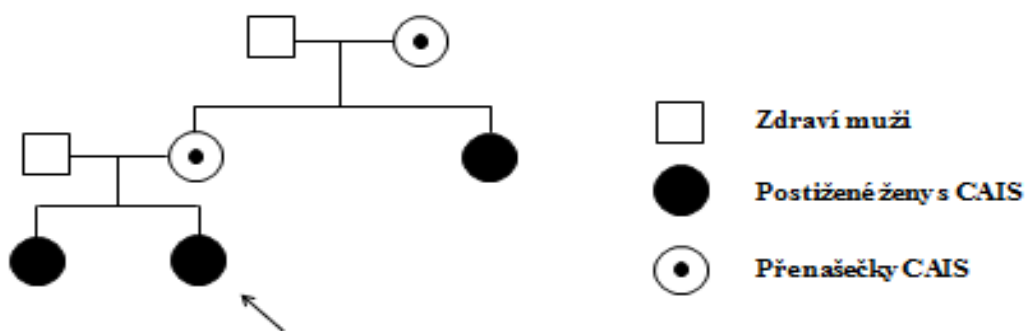
V práci 3.1.1. a 3.1.2. popisujeme výskyt syndromu úplné androgenní insenzitivity a přenašečství onemocnění u několika rodinných příslušníků. V rodině byla potvrzena mutace v genu pro androgenní receptor c.2495G >T p.(Arg832Leu) v exonu 7, který je lokalizován na chromosomu X. Diagnóza CAIS byla náhodná při vyšetření dítěte pro malý vzrůst. V práci 3.1.1. upozorňujeme současně také na etické aspekty, se kterými se setkáváme u takto postižených jedinců. K odhalení této diagnózy a přenašečství v rodině vedlo vyšetření dívky, která byla odeslána k endokrinologickému vyšetření pro malý vzrůst v 9 letech věku. Narodila se z 1. gravidity z nepříbuzenského sňatku ve 36. týdnu gestace po spontánním porodu s porodní hmotností 2070 g a porodní délkou 45 cm, hraničně splňovala kritéria pro intrauterinní růstovou retardaci nejasné příčiny. Bezprostřední poporodní adaptace byla nekomplikovaná, na hmotnosti vždy hůře prospívala, psychomotorický vývoj byl fyziologický. V rodinné anamnéze 33letá sestra matky dítěte se syndromem úplné androgenní insenzitivity podstoupila ve 13 letech věku gonadektomii. Z antropometrických parametrů byla dívka výškou 120 cm v pásmu velmi malé výšky pod 3. percentilem, podle BMI (body

mass index) 13,6 kg/m<sup>2</sup> byla v pásmu snížené výživy. Růstová křivka ukazovala lineární růst pod 3. percentilem bez progresivního růstového opožďování. V objektivním nálezu měla hmatnou levostrannou tříselnou kýlu, byla prepubertální a její zevní genitál byl ženský. Z hlediska vyšetření malého vzrůstu jsme vyloučili endokrinní poruchu a chronické onemocnění systémové povahy. V rámci komplexního vyšetření, vzhledem k rodinné anamnéze a hmatné tříselné kýle jsme doplnili cytogenetické vyšetření, které prokázalo chromosomálně mužské pohlaví, karyotyp 46,XY, tedy poruchu sexuální diferenciaci. Sonografické vyšetření potvrdilo oboustranně na přechodu dutiny břišní a třísla struktury podobné varleti. Děloha a ovaria sonograficky nebyla verifikována. Gynekologem byla popsána slepě končící pochva délky 4-5 cm. Test androgenní senzitivity potvrdil necitlivost receptorů k androgenům. Syndrom úplné androgenní insenzitivity byl potvrzen molekulárně geneticky. Stejná mutace v genu pro androgenní receptor byla potvrzena u matky pacientky, babičky a tety. Matka pacientky a její babička jsou přenašečkami onemocnění. Vzhledem k potvrzenému přenašečství onemocnění v rodině jsme provedli cytogenetické vyšetření u 5leté sestry s potvrzením karyotypu 46,XY. U sourozenců byla provedena bilaterální laparoskopická gonadektomie. Histologické vyšetření potvrdilo atrofické gonády centrálně fibrotizované, v periferních partiích se zastiženými tubulárními strukturami tvořenými Sertoliho buňkami bez zachycené spermiogeneze, bez Leydigových buněk v intersticiu a bez germinální neoplazie. V současné době je u dívek navozována puberta estrogeny.

Závěry práce 3.1.1. a 3.1.2. a výstupy pro klinickou praxi. Diagnóza CAIS u naší pacientky a u její sestry v důsledku mutace v genu pro androgenní receptor c.2495G >T p.(Arg832Leu) v exonu 7 byla náhodná při vyšetření dítěte pro malý vzrůst. Cytogenetické vyšetření jsme indikovali v rámci komplexního vyšetření malého vzrůstu, s ohledem na rodinnou anamnézu CAIS u tety dívky a pro přítomnost levostranné tříselné kýly. Potvrdili jsme přenašečství mutace v genu pro androgenní receptor v rodině. Pozdní diagnóza přenašečství mutace byla způsobena neinformováním rodiny o výskytu CAIS babičkou naší pacientky. Z tohoto důvodu nebylo provedeno komplexní genetické vyšetření rodiny, které by odhalilo přenašeče onemocnění s poskytnutím možné prenatální diagnostiky CAIS. CAIS je nejčastěji diagnostikován v dětství v souvislosti s tříselnou kýlou u dívek nebo s labiálním otokem, který obsahuje testes. Incidence CAIS u kojence s fenotypicky ženským zevním genitálem a s oboustrannou tříselnou kýlou je 1-2%. V těchto případech se proto doporučuje vyšetření karyotypu dítěte. K diagnóze dále může vést primární amenorea nebo prenatální diskrepance mezi ultrasonograficky diagnostikovaným ženským pohlavím a karyotypem 46,XY z plodové vody. Růst v pásmu velmi malé výšky pod 3. percentilem není pro tyto děti

typický. Podle komplexně provedených vyšetření byla příčinou poruchy růstu u naší pacientky a její sestry intrauterinní růstová retardace s postnatálním růstovým selháním a genetická dispozice k malému vzrůstu ze strany matky. Nesestouplá testes jsou vystavena zvýšenému riziku maligního zvratu, které je u prepubertálních jedinců nízké. Pokud není gonadektomie provedena v dětském věku, doporučuje se její provedení v časně dospělosti. Obvykle se testes odstraňují po pubertě. Po odstranění gonád je nezbytná trvalá substituční terapie estrogy, progesteron se pro absenci dělohy nepodává. Naše pacientky podstoupily laparoskopickou gonadektomii ve věku 9 a 6 let, a to bez nálezu nádorových buněk. V 11 letech věku jsme zahájili substituci estrogy. Důležitou součástí terapie je psychosociální podpora těchto jedinců a jejich rodin. V práci se zabýváme také etickými aspekty možné prenatální diagnostiky onemocnění v postižených rodinách, které považujeme v kontextu choroby za důležité. Podle našeho názoru by rodiče měli mít možnost volby prenatální diagnostiky s eventuálním rozhodnutím o ukončení těhotenství v případě potvrzení CAIS. S tímto stanoviskem ale řada zahraničních autorů nesouhlasí.

**Rodokmen rodiny s CAIS**



# **4. ČÁST**

## **DIABETES MELLITUS**

**4.1. Thiamin-responzivní megaloblastická anemie jako vzácná forma monogenního diabetu mellitu; příčina neonatálního diabetu mellitu; mutace *SLC19A2* genu s poruchou funkce membránového přenašeče thiaminu do buňky; první 2 pacienti v České republice; nová mutace v *SLC19A2* genu, c.204+2T>G v intronu 1**

(komentář 3 publikací)

**4.1.1. First 2 cases with thiamine-responsive megaloblastic anemia in the Czech Republic, a rare form of monogenic diabetes mellitus: a novel mutation in the thiamine transporter *SLC19A2* gene- intron 1 mutation c.204+2T>G**

Pomahacova R, Zamboryova J, Sykora J, Paterová P, Fiklik K, Votava T, Cerna Z, Jehlicka P, Lad V, Subrt I, Dort J, Dortova E.

*Pediatric Diabetes*, 2017, vol. 18, no. 8, p. 844-847. doi: 10.1111/pedi.12479. Epub 2016 Dec 22.

**4.1.2. Recessive *SLC19A2* mutations are a cause of neonatal diabetes mellitus in thiamine- responsive megaloblastic anaemia**

Shaw-Smith C, Flanagan SE, Patch AM, Grulich-Henn J, Habeb AM, Hussain K, Pomahacova R, Matyka K, Abdullah M, Hattersley AT, Ellard S.

*Pediatr Diabetes*, 2012 Jun;13(4): 314-21. doi: 10.1111/j.1399-5448.2012.00855.x. Epub 2012 Feb 27

**4.1.3. Pharmacogenomics in diabetes: outcomes of thiamine therapy in TRMA syndrome**

Habeb AM, Flanagan SE, Zulali MA, Abdullah MA, Pomahacova R, Boyadzhiev V, Colindres LE, Godoy GV, Vasanthi T, Al Saif R, Setoodeh A, Haghighi A, Haghighi A, Shaalan Y; International Neonatal Diabetes Consortium, Hattersley AT, Ellard S, De Franco E.

*Diabetologia*, 2018 May;61(5):1027-1036. doi: 10.1007/s00125-018-4554-x. Epub 2018 Feb 15

Thiamin-responzivní megaloblastická anemie (TRMA) je vzácné autozomálně recesivně dědičné onemocnění způsobené mutací *SLC19A2* genu (lokalizace na chromosomu 1q23.2-23), která vede k poruše funkce membránového přenašeče thiaminu do buňky (THTR-1) s intracelulárním deficitem thiaminu. Kompenzačním mechanismem je exprese jak transportéru THTR-1, tak membránového transportéru pro thiamin THTR-2 ve většině tkání, takže intestinální absorpce thiaminu je zachována a jeho plazmatická hladina je normální. Nejvíce jsou postiženy vláskové buňky vnitřního ucha, β-buňky pankreatu a prekurzorové

buňky erythropoézy, které exprimují pouze transportér THTR-1. Z toho vyplývá klasická triáda příznaků u TRMA - megaloblastická anemie, diabetes mellitus (DM) a progresivní sensorineurální hluchota (87). Mezi další symptomy patří pancytopenie, abnormality zrakového nervu a sítnice (atrofie optických nervů, dystrofie sítnice, retinitis pigmentosa), vrozené srdeční vady (defekt septa síní a komor, mitrální, trikuspidální insuficience, Ebsteinova anomálie), arytmie (supraventrikulární tachykardie, fibrilace, flutter síní), kardiomyopatie a epilepsie (88,89). Thiamin vstupuje do buněk tedy aktivním transportem pomocí THTR-1 a THTR-2, který je kódován *SLC19A3* genem (90). Při vysoké plazmatické koncentraci vstupuje thiamin do buněk také pasivním transportem. Thiamin hraje důležitou roli v energetickém metabolismu buňky. Je součástí thiaminpyrofosfátu, což je kofaktor enzymů pentózového cyklu, oxidativní dekarboxylace a citrátového cyklu. Pro fyziologický energetický metabolismus buňky je nezbytná vysoká intracelulární koncentrace thiaminu. Intracelulární deficit thiaminu vede k apoptóze buněk. Časná diagnóza a suplementace thiaminem, která zvýší pasivní transport thiaminu do buněk, zlepšuje nebo oddaluje anemii, trombocytopenii, diabetes mellitus a poruchu vizu. Porucha sluchu se vyvíjí i přes časnou suplementaci thiaminem. Vzniká ztrátou receptorových vláskových buněk vnitřního ucha při intracelulárním deficitu thiaminu. Dosud bylo popsáno méně než 80 případů s TRMA, především v Asii a na Středním východě. V Evropě bylo popsáno jen několik případů. V *SLC19A2* genu bylo popsáno nejméně 43 mutací (91).

V naší práci 4.1.1. popisujeme dvě pacientky s TRMA poprvé diagnostikované a popsané v České republice. Provedli jsme podrobnou klinickou a genetickou analýzu těchto jedinců. Genetická analýza (Exeter, Velká Británie) potvrdila 3 mutace v *SLC19A2* genu, jedna z těchto mutací (c.204+2T>G v intronu 1) dosud nebyla popsána. První pacientka, nyní 13letá, se narodila v termínu z 1. nekomplikované gravidity z nepříbuzenského sňatku, s fyziologickou poporodní adaptací s porodní hmotností 3300 g a s porodní délkou 50 cm. Její psychomotorický vývoj byl fyziologický. V 7 měsících věku byla u dítěte diagnostikována megaloblastická anemie a diabetes mellitus neautoimunní etiologie bez osmotické symptomatologie a bez diabetické ketoacidózy. Z monogenních forem DM byla vyloučena mutace v *ABCC8* genu, v *KCNJ11* genu a homozygotní mutace v genu pro glukokinázu. Zahájili jsme léčbu inzulinem s trvale uspokojivou kompenzací DM. Ve 3 letech věku se vyvinula porucha vizu při bilaterální čípkové dystrofii, v 5 letech sensorineurální porucha sluchu a v 8 letech těžká anemie a trombocytopenie. Vyšetření kostní dřeně ukázalo megaloblastické změny. Při substituci thiaminem 50 mg/den došlo k normalizaci krevního obrazu. Mutace v *SLC19A2* genu potvrdila TRMA. Pacientka je složený heterozygot pro

mutaci p.Gly334Asp (c.1001G>A) v exonu 3 a mutaci p.Val383fs (c.1148\_1149del) v exonu 4. Druhá, nyní 5letá pacientka, se narodila ze 2. nekomplikované gravidity z nepříbuzenského sňatku, s fyziologickou poporodní adaptací. Ve 2 letech věku byl u ní diagnostikován diabetes mellitus neautoimunní etologie, megaloblastická anemie, trombocytopenie a síňová ektopická tachykardie. Empiricky nasazená suplementace thiaminem 50 mg/den normalizovala anemii, trombocytopenii a stabilizovala DM. Kompenzace DM je při léčbě inzulínem trvale uspokojivá. Terapie propafenonem normalizovala EKG. Mutace v *SLC19A2* genu potvrdila TRMA. Pacientka je složený heterozygot pro mutaci p. ? (c.204+2T>G) v intronu 1 a mutaci p.Gly334Asp (c.2001G>A) v exonu 3. V 5 letech věku při substituci thiaminem nemá poruchu vizu, ale přes časnou substituci se vyvinula hluchota. V průběhu akutní gastroenteritidy se u ní rozvinula diabetické ketoacidóza.

Závěry práce 4.1.1., 4.1.2., 4.1.3. a výstupy pro klinickou praxi. TRMA je velmi vzácná klinická jednotka s výskytem především v Asii a na Středním východě. Jedná se o vzácnou formu monogenně podmíněného DM a podle studie 4.1.2. může být příčinou permanentního neonatálního DM. Tato práce dokládá vývoj DM u TRMA ve 3 případech v prvních 6 měsících života a 2 případech vývoj DM mezi 6-12 měsíci života. TRMA nebyla dosud zavzata do diferenciální diagnózy novorozeneckého DM. V práci 4.1.1. popisujeme 2 pacientky s TRMA poprvé popsané v České republice. Jedna ze zjištěných mutací (mutace c.204+2T>G v intronu 1) dosud nebyla popsána. U našich pacientek byla přítomna klasická triáda příznaků zahrnující megaloblastickou anemii, diabetes mellitus a senzorineurální poruchu sluchu. Z dalších symptomů TRMA jsme diagnostikovali arytmií (síňová ektopická tachykardie) a poruchu vizu při bilaterální čípkové dystrofii. Podle literárních zdrojů nebyla nalezena korelace mezi kardiálními symptomy a genotypem u TRMA. Substitute thiaminu v dávce 50 mg/den u obou dětí vedla k normalizaci krevního obrazu a k dlouhodobé prevenci vývoje těžké anemie a trombocytopenie. Stejně závěry uvádí práce 4.1.3., kde nebyl pozorován benefit podávání vysokých dávek thiaminu nad 150 mg/den a nebyly pozorovány nežádoucí účinky vysokých dávek thiaminu do 300 mg/den. Substitute thiaminu u naší pacientky 1 zlepšila metabolickou kontrolu DM s poklesem potřeby inzulínu. Časná substitute thiaminu v případě pacientky 2 nezabránila vývoji senzorineurální poruchy sluchu, nejasná je prevence očního postižení při zahájení časně substitute. Senzorineurální porucha sluchu u TRMA, na podkladě našeho pozorování, není kongenitální. Substitute thiaminu nevede ke zlepšení sluchu. Podle literárních zdrojů včetně uvedené práce 4.1.3. léčba thiaminem zlepšuje kompenzaci DM s poklesem potřeby inzulínu, ale s progresí endokrinní insuficience pankreatu s akcelerací v pubertě vlivem redukce  $\beta$ -buněk při apoptóze v důsledku

intracelulárního deficitu thiaminu. V práci 4.1.3. u 4 z 15 jedinců bylo možno po zahájení substituce thiaminem ukončit léčbu inzulínem a u 7 jedinců se zlepšila kontrola DM s redukcí inzulínových dávek. U naší pacientky 1 vedla časná substituce thiaminu ke zlepšení metabolické kontroly DM s poklesem potřeby inzulínu na začátku léčby. U pacientky 2 došlo ke vzestupu potřeby inzulínu v pubertě z 0,5 jednotky/kg/den na 1 jednotku/kg/den přes substituci thiaminem, ale metabolická kontrola DM se zlepšila. Podle závěrů práce 4.1.3. může být diabetes mellitus u TRMA asymptomatický a může předcházet vývoji dalších symptomů TRMA. Diagnóza TRMA je důležitá pro časně zahájení substituce thiaminem, která zlepšuje metabolickou kontrolu DM a v některých případech může zabránit léčbě inzulínem. Potvrzení diagnózy je molekulárně genetické. Ve shodě s literárními údaji jsme potvrdili, přes C-peptid pozitivitu, možnost vývoje diabetické ketoacidózy u TRMA v případě akutní stresové situace jako je například akutní gastroenteritida.



## **4.2. Monogenně podmíněný diabetes MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young) v dětském věku**

(komentář 1 publikace)

### **4.2.1. Monogenně podmíněný diabetes MODY v dětském věku: retrospektivní studie pacientů diagnostikovaných na Dětské klinice FN Plzeň v letech 2000-2017** **Monogenic diabetes MODY in childhood: a retrospective study of patients diagnosed at the Department of Pediatrics, University Hospital in Pilsen in 2000-2017**

Zamboryová J, Pomahačová R, Fiklík K, Elblová L, Sýkora J.  
*Česko-slovenská pediatrie*, 2019, vol. 74, no. 1, p. 16-21.

Monogenně podmíněný diabetes je forma diabetu mellitu (DM), která je způsobena odchylkou jediného genu. Podle odhadů postihuje tato forma diabetu 3-5 % všech diabetických pacientů. Řada pacientů s monogenním diabetem bývá prvotně vedena pod diagnózou diabetes mellitus 1. nebo 2. typu. Většina případů monogenního diabetu mellitu je u dětí způsobena mutacemi v genech regulujících funkci  $\beta$ -buněk pankreatu. MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young) je definovaný jako DM s časným začátkem a autozomálně dominantní dědičností. Projevuje se jako glukokinázový diabetes nebo jako diabetes transkripčních faktorů (92). Správné určení monogenně podmíněného typu diabetu je důležité pro zahájení vhodné terapie. Glukokinázový diabetes (familiární mírná hyperglykémie, GCK-MODY, dříve MODY2) je způsobený heterozygotním nosičstvím mutace v genu pro glukokinázu (GCK). Homozygotní mutace v tomto genu je příčinou permanentního novorozeneckého diabetu. GCK-MODY je charakterizován chronickou mírnou hyperglykemií od narození do stáří, s minimální progresí během života (93). Hyperglykémie při GCK-MODY vzniká na podkladě poruchy funkce enzymu glukokinázy, který je senzorem  $\beta$ -buněk pro glukózu. V důsledku tohoto defektu  $\beta$ -buňky zahajují sekreci inzulínu při vyšší glykémii než 5 mmol/l. Většinou se jedná o asymptomatickou, náhodně zjištěnou hyperglykémii. U pacientů je typicky mírně zvýšená lačná glykémie o 2-3 mmol/l nad fyziologickou mez. Při orálním glukózovém tolerančním testu (oGTT) mají pacienti normální glukózovou toleranci nebo splňují kritéria pro poruchu glukózové tolerance. Při intravenózním glukózovém tolerančním testu (ivGTT) vykazují fyziologickou iniciální fázi sekrece inzulínu  $\beta$ -buňkami pankreatu. Specifické autoprotilátky proti  $\beta$ -buňkám pankreatu

jsou negativní. K progresi poruchy do diabetu mellitu nedochází. GCK-MODY nevyžaduje léčbu inzulínem, doporučují se dietní opatření s omezením rychle působících sacharidů. Inzulinoterapie je někdy podávána pouze u žen v graviditě (92). Nejčastější formou diabetu transkripčních faktorů (HNF-diabetes) je HNF1A-MODY (dříve MODY3), způsobený heterozygotní mutací v genu pro hepatocytární nukleární faktor-1 alfa, HNF4A-MODY (dříve MODY1), který vzniká na podkladě heterozygotního nosičství mutace v genu pro hepatocytární nukleární faktor-4 alfa a HNF1B-MODY (syndrom renálních cyst a diabetu, dříve MODY5), způsobený mutací v genu pro hepatocytární nukleární faktor-1 beta (94). V prvních letech života mají pacienti normální glukózovou toleranci, postupně dochází k selhání funkce  $\beta$ -buněk s rozvojem diabetu v dětství, adolescenci nebo časně dospělosti. HNF-diabetes se většinou manifestuje jako náhodně zjištěná hyperglykémie nebo se projeví osmotickými příznaky. Typická bývá pozitivní rodinná anamnéza DM a negativní specifické autoprotilátky proti  $\beta$ -buňkám pankreatu. Diabetes není životně závislý na inzulínu. Vysazení inzulínu nevede přímo ke ketoacidóze, ale v zátěžových situacích, jako je například dehydratace při akutní gastroenteritidě, se diabetická ketoacidóza může vyvinout. Pro tento typ diabetu je typická nízká potřeba inzulínu a pozitivní C-peptid více než 3 roky po manifestaci diabetu. Pacienti jsou ohroženi pozdními diabetickými komplikacemi, proto je u nich nezbytná optimální metabolická kontrola. Diabetes lze léčit deriváty sulfonylurey.

Cílem retrospektivní studie 4.2.1. bylo zmapování výskytu monogenního diabetu MODY u pacientů diagnostikovaných na Dětské klinice Fakultní nemocnice v Plzni v letech 2000-2015. Hodnoceno bylo zastoupení pohlaví v souboru, věk v době diagnózy, familiární výskyt onemocnění, vstupní parametry sacharidového metabolismu (glykémie nalačno, glykovaný hemoglobin HbA1c), zátěžové testy (oGTT, ivGTT) a specifické autoprotilátky proti  $\beta$ -buňkám pankreatu. Soubor tvořilo 16 pacientů s monogenním diabetem MODY, z toho 9 dívek a 7 chlapců průměrného věku 10,2 roku (rozmezí 3-17 let). V hodnoceném souboru bylo zahrnuto 13 pacientů s glukokinázovým diabetem (GCK-MODY) a 3 pacienti s HNF-diabetem (HNF1A-MODY, HNF4A-MODY a HNF1B-MODY). U všech pacientů byl retrospektivně pro zachycenou zvýšenou lačnou glykémii (glykémie  $> 5,6$  mmol/l) proveden orální glukózový toleranční test (oGTT). Jedinci s patologickým oGTT (porucha glukózové tolerance s glykemií ve 120. minutě po podání glukózy 7,8-11,1 mmol/l nebo diabetický průběh zátěžové křivky s glykemií ve 120. minutě nad 11,1 mmol/l) podstoupili intravenózní glukózový toleranční test (ivGTT) ke zjištění první fáze stimulované inzulínové sekrece (FPIR „first-phase insulin response“ = součet hladin inzulínu v 1. a 3. minutě po intravenózně podaném bolusu glukózy). Za normu byla považována u prepubertálních pacientů FPIR nad

30 mIU/l, v pubertě nad 40 mIU/l a postpubertálně nad 45 mIU/l. U všech pacientů byly stanoveny specifické autoprotilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové (anti-GAD), proti tyrosinfosfatáze (anti-IA2), proti inzulínu (anti-IRI) jako markery autoimunitní inzulitidy a glykovaný hemoglobin HbA1c (norma < 40 mmol/mol). K potvrzení MODY diabetu bylo provedeno molekulárně genetické vyšetření DNA (Laboratoř molekulární genetiky Pediatrické kliniky 2. LF UK a FN v Motole).

Výsledky studie 4.2.1. Glukokinázový diabetes byl potvrzen u 13 pacientů, z toho u 8 dívek a 5 chlapců ve věkovém rozmezí 3-15 let (medián 11 let). Retrospektivně byla u všech pacientů při prvovýšetření zjištěna zvýšená lačná glykémie (rozmezí 6,0-7,4 mmol/l). oGTT potvrdil ve 12 případech (94%) poruchu glukózové tolerance, v 1 případě byla glukózová tolerance normální. Žádný pacient neměl diabetický průběh zátěžové křivky s glukózou. Hodnota glykovaného hemoglobinu HbA1c v době stanovení diagnózy byla ve všech případech zvýšená (rozmezí 41-50 mmol/mol; medián 46 mmol/mol). ivGTT vykazoval fyziologickou FPIR. Specifické protilátky proti pankreatu (anti-GAD, anti-IA2, anti-IRI) byly negativní. Diagnóza glukokinázového diabetu byla u všech jedinců potvrzena molekulárně geneticky. Jedna rodina je nositelem nejčastěji popisované mutace p.Glu40Lys v genu pro GCK v České republice. Příslušníci dvou rodin jsou nositeli stejné mutace p.Glu268Ter. V jedné rodině byly zjištěny dvě mutace na jedné alele v genu pro GCK (p.Val226Glu, p.Ala188Thr). Pozitivní rodinná anamnéza poruchy sacharidového metabolismu byla v souboru přítomna v 11 rodinách (85%); z toho anamnéza gestačního diabetu ve 4 případech, u jednoho člena rodiny byl diabetes léčen inzulínem a veden jako DM 1. typu, 6 osob bylo léčeno jako DM 2. typu perorálními antidiabetiky (PAD). Potvrzení diagnózy glukokinázového diabetu umožnilo u těchto jedinců vysazení inzulínu a PAD. Diabetes transkripčních faktorů byl potvrzen u 3 pacientů, z toho u 2 chlapců a 1 dívky ve věkovém rozmezí 5-17 let (medián 13 let). Pacienti s HNF-diabetem měli diabetický průběh oGTT a sníženou FPIR při ivGTT. Hodnota glykovaného hemoglobinu v době stanovení diagnózy byla zvýšená (medián 64 mmol/mol, rozmezí 52-68). Specifické protilátky proti pankreatu byly negativní. Diagnóza diabetu u pacientky s HNF4A-MODY a u pacienta s HNF1B-MODY diabetem byla stanovena na základě náhodně zachycené hyperglykémie bez osmotické symptomatologie. U pacienta s HNF1A-MODY diabetem byla diagnóza stanovena na podkladě znalosti této diagnózy u matky a u dalších rodinných příslušníků. K podezření na diagnózu diabetu transkripčních faktorů vedl u dětí výskyt diabetu mellitu v rodině ve dvou generacích, u pacientky s HNF4A-MODY současně více než 3 roky trvající pozitivita C-peptidu, chybějící vývoj diabetické ketoacidózy po vysazení inzulínu při non-compliance

v léčbě a negativní autoprotilátky proti pankreatu. U pacienta s HNF1B-MODY bylo vysloveno podezření na tento diabetes díky přítomnosti renální anomálie (solitární levá ledvina s hydronefrózou a megaureterem). Tento pacient nese heterozygotní delecí celého genu *HNF1B*. Diagnóza HNF4A-MODY diabetu u naší pacientky vedla k potvrzení stejné diagnózy u dalších rodinných příslušníků, kteří byli vedeni pod diagnózou DM 1. typu, byli léčeni inzulínem a měli závažné pozdní komplikace diabetu. Znalost mutace v genu *HNF4A* v této rodině současně umožnila vyšetření nevlastní sestry pacientky s vyloučením nosičství dané mutace. V rodině s HNF1A-MODY diabetem umožnila znalost mutace v genu *HNF1A* potvrzení nosičství stejné mutace u dalších členů rodiny, u kterých je pravidelně sledována glukózová tolerance. Pacienti s potvrzeným HNF4A-MODY a HNF1B-MODY diabetem byli převedeni z léčby inzulínem na léčbu PAD. Pacient se známou mutací v genu *HNF1A* byl po stanovení diagnózy HNF1A-MODY diabetu nastaven již přímo na terapii derivátem sulfonylurey.

Závěry retrospektivní studie 4.2.1. a výstupy pro klinickou praxi. Ve shodě s literárními údaji jsme potvrdili převahu benigní formy glukokinázového GCK-MODY diabetu. K suspekci na MODY diabetes s indikací k molekulárně genetickému vyšetření nás vedl výskyt poruchy sacharidového metabolismu v rodinách v několika generacích, negativní autoprotilátky proti  $\beta$ -buňkám pankreatu, trvající pozitivita C-peptidu s nízkou potřebou inzulínu, chybějící rozvoj diabetické ketoacidózy po vysazení inzulínu a přítomnost renální anomálie u pacienta s HNF1B-MODY. Znalost genové mutace umožnila v našem souboru časnou diagnózu MODY diabetu u dalších rodinných příslušníků s volbou optimální terapie. Molekulárně genetické vyšetření je v indikovaných případech rozhodující pro diagnózu diabetu MODY a pro určení jeho podtypů. K vyšetření jsou indikováni pacienti s pozitivní rodinnou anamnézou diabetu s výskytem nemoci do 30 let věku v každé generaci. Genetické testování MODY lze zvážit i u pečlivě vybraných jedinců bez rodinné anamnézy diabetu. Mezi podpůrná kritéria indikace k molekulárně genetickému vyšetření MODY patří manifestace diabetu bez diabetické ketoacidózy, trvalá stacionární mírná hyperglykémie, dobrá kompenzace diabetu na malých dávkách inzulínu, na dietě nebo na PAD, snížený renální práh pro glukózu (glykosurie při normální glykémii) a negativní autoprotilátky proti  $\beta$ -buňkám pankreatu. K diagnóze GCK-MODY diabetu vedl u všech našich pacientů náhodný záchyt mírně zvýšené lačné glykémie, spolu se zvýšenou hodnotou glykovaného hemoglobinu, nediabetický průběh oGTT, fyziologický FPIR při ivGTT testu a negativita specifických autoprotilátek proti pankreatu. Diagnóza GCK-MODY byla ve všech případech potvrzena molekulárně geneticky. V jedné rodině byla potvrzena nejčastěji popisovaná

mutace E40K v genu pro GCK v České republice. oGTT vykazoval v 94% poruchu glukózové tolerance, ostatní pacienti měli normální glukózovou toleranci. V průběhu našeho sledování zůstává glukózová tolerance, ve shodě s literárními údaji, stacionární. Léčba inzulinem je indikována pouze u gravidních žen s GCK MODY, pokud podle ultrazvukového vyšetření hrozí makrosomie plodu. Právě těhotenství bývá u těchto žen prvním momentem, kdy je zjištěna hyperglykémie. Podle literárních údajů je mutace v genu pro glukokinázu nalezena u 1-4 % žen s gestačním diabetem. V našem souboru byla anamnéza gestačního diabetu přítomna ve 4 případech. Pozitivní rodinná anamnéza poruchy sacharidového metabolismu byla v souboru pacientů s GCK-MODY přítomna v 11 rodinách (85%). Potvrzení diagnózy GCK-MODY diabetu u těchto rodinných příslušníků umožnilo vysazení inzulinu nebo PAD se zlepšenou kvalitou života. Diabetes transkripčních faktorů (HNF1A-MODY, HNF4A-MODY a HNF1B-MODY) byl v souboru potvrzen ve 3 případech. K diagnóze HNF-diabetu (HNF4A-MODY a HNF1A-MODY) vedl, ve shodě s literárními údaji, výskyt diabetu mellitu v rodině ve dvou generacích, u pacientky s HNF4A-MODY současně více než 3 roky trvající pozitivita C-peptidu a chybějící vývoj diabetické ketoacidózy po vysazení inzulinu. U HNF4A-MODY je u 56% nositelů mutace tendence k novorozenecké makrosomii, která může být provázena v 15% tranzitní novorozeneckou hypoglykemií. V rodině s HNF4A-MODY diabetem jsme anamnesticky novorozeneckou makrosomii a novorozeneckou hypoglykemií nezjistili. V rodině s HNF1A-MODY diabetem vedla znalost mutace v *HNF1A* genu k potvrzení nosičství stejné mutace u další členů rodiny, u kterých pravidelně sledujeme glukózovou toleranci. Pacienti s HNF1A-MODY diabetem mají snížený renální práh pro glukózu, což lze využít pro screening u příbuzných pacientů s tímto typem diabetu. U pacienta s HNF1B-MODY vedla k diagnóze dlouhodobě nápadně nízká potřeba inzulinu a přítomnost renální anomálie se solitární levou ledvinou s hydronefrózou a megaureterem. Pacienti s HNF4A-MODY a HNF1B-MODY diabetem byli převedeni z léčby inzulinem na léčbu PAD. V případě naší pacientky s HNF4A-MODY došlo k výraznému zlepšení kompenzace diabetu s poklesem hladiny HbA1c. Pacient z rodiny s HNF1A-MODY byl, díky znalosti genové mutace, po stanovení diagnózy DM nastaven na léčbu derivátem sulfonylurey II. generace v jedné denní dávce. Jeho kompenzace diabetu je výborná.

### **4.3. Oxidační stres u diabetu mellitu typu 1 u dětí a jejich prvostupňových příbuzných; suplementace vitamínem E a C; poškození a reparace DNA**

(komentář 2 publikací)

#### **4.3.1. Parameters of oxidative stress in children with Type 1 diabetes mellitus and their relatives.**

Varvařovská J, Racek J, Stožický F, Souček J, Trefil L, Pomahačová R.  
*Journal of Diabetes and its Complications*, 2003, vol. 17, no. 1, p. 7-10.  
DOI:/10.1016/S1056-8727(01)00228-8

#### **4.3.2. Aspects of oxidative stress in children with type 1 diabetes mellitus**

Varvařovská J, Racek J, Štětina R, Sýkora J, Pomahačová R, Rušavý Z, Lacigová S, Stožický F.  
*Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2004, vol. 58, no. 10, p. 539-545.  
DOI:/10.1016/j.biopha.2004.09.011

Oxidační stres (OS) vzniká při nerovnováze mezi tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS) a antioxidační ochranou organismu (AOO). Pokud převládnu ROS nad AOO, rozvíjí se oxidační stres. OS u jedince s genetickou predispozicí k diabetu mellitu typu 1 (T1DM) hraje důležitou roli v patogenezi onemocnění. OS vzniká jak v průběhu úvodní destruktivní autoimunitní inzulitidy lokálně v pankreatu, tak později u rozvinutého T1DM při hyperglykemii v důsledku metabolických procesů glykace proteinů s rozvojem konečných produktů pokročilé glykace (AGE- advanced glycosylated end-products), autooxidace glukózy a glykoxidace AGE. Následuje aktivace zánětlivých, trombotických a apoptotických procesů a rozvoj pozdních mikrovaskulárních komplikací DM (95,96,97). Vitamin C a E patří mezi antioxidační látky, které chrání organismus před dopadem účinku reaktivních forem kyslíku (98,99).

Cílem studie 4.3.1. bylo porovnat parametry OS u diabetických dětí a jejich prvostupňových příbuzných (rodiče, sourozenci). Do studie bylo zařazeno 50 dětí s T1DM (21 dívek a 29 chlapců; věk 2,5-19,5 roku, průměrný věk 11,96±4,69 SD) z oblasti Karlovarského a Plzeňského kraje. Průměrná doba trvání choroby byla 4,25 roku. Žádné z dětí nemělo mikrovaskulární komplikace. U diabetických dětí byly vyšetřeny markery OS (SOD-superoxiddismutáza, GPx-glutathionperoxidáza, AOC-antioxidační kapacita plazmy,

GSH-glutathion, MDA-malondialdehyd). Markery OS byly vyšetřeny současně u rodičů (41 matek a 24 otců průměrného věku  $38,74 \pm 6,01$  let) a sourozenců diabetických dětí (20 dívek a 12 chlapců průměrného věku  $13,69 \pm SD 4,41$  roky). Výsledky markerů OS u diabetických dětí a jejich sourozenců byly porovnány s hodnotami těchto parametrů odebraných u skupiny zdravých dětí před plánovanou operací kýly nebo fimózy, věkově i zastoupením pohlaví srovnatelných s diabetickými pacienty. Výsledky parametrů OS u rodičů byly porovnány s jejich diabetickými dětmi a dále s hodnotami 40 zdravých dospělých dobrovolníků.

Výsledky a závěry studie 4.3.1. Ve shodě s jinými autory jsme potvrdili přítomnost poškozené antioxidační ochrany u diabetických dětí. Byly zjištěny nízké hodnoty jak extracelulární antioxidační ochrany (AOC), tak intracelulární ve smyslu nízkého glutathionu a GPx. Nízká aktivita GPx má vliv na snížené odbourávání peroxidu vodíku, který vzniká během autoimunitní inzulitidy a který je toxický pro  $\beta$ -buňky pankreatu. Ve studii nebyl potvrzen statisticky významný vztah mezi jakýmkoli parametrem OS a kompenzací diabetu (HbA1c), rovněž ne mezi OS a trváním choroby. U sourozenců diabetických dětí byla rovněž zjištěna tendence ke snížené antioxidační ochraně (nižší hodnoty GPx a AOC), naproti tomu MDA jako marker peroxidace lipidů byl zvýšen, i když nálezy nebyly významné. Pouze hodnota GPx oproti zdravým dětem byla signifikantně nižší. Jsme toho názoru, že uvedené výsledky sourozenců diabetických dětí mohou být významné z hlediska nižší obrany proti OS při možném vývoji autoimunitní inzulitidy a následné destrukci  $\beta$ -buněk u geneticky vnímavých jedinců. Naše výsledky potvrdily nižší hodnotu GPx jak u diabetických dětí, tak u jejich sourozenců. Tento nálezy tedy vylučuje možnost, že nižší aktivita GPx je důsledek samotného diabetu, ale jde nejspíše o geneticky podmíněnou nižší aktivitu tohoto enzymu u sourozenců. GPx hraje významnou úlohu při odbourávání peroxidu vodíku v organismu, tedy i v pankreatu. Při nízké aktivitě GPx tedy dochází k akumulaci peroxidu vodíku a při destruktivní autoimunitní inzulitidě následně ke zničení  $\beta$ -buněk. Poškozená antioxidační ochrana a nadprodukce volných radikálů (VR) přispívají nepochybně k patogenezi T1DM a také k rozvoji pozdních diabetických komplikací. Zajímavé je, že rodiče diabetických dětí měli normální parametry OS, které se nelišily od zdravých dospělých.

Cílem navazující intervenční studie 4.3.2. bylo zjistit, zda jednorocní suplementace vitamínem C a E povede ke snížení OS u dětí s T1DM a ke zlepšení metabolické kontroly DM. Do studie bylo zařazeno 38 diabetických dětí (19 chlapců a 19 dívek) průměrného věku  $12,5 \pm SD 4,17$  let, se špatnou kompenzací DM (HbA1c  $11,55\% \pm SD 2,7$ - DCCT, glykovaný protein  $382 \pm SD 60,9$   $\mu\text{mol/l}$ ), a průměrným trváním DM 2,4 roku. Iroční suplementace byla podávána vždy 3 měsíce a 3 měsíce měli pacienti pauzu. Do hmotnosti 25 kg dostávali

vitamin C 100 mg denně a vitamin E 1 capsli denně, do hmotnosti 50 kg oba vitaminy v dávce 2x1 a nad 50 kg 3x1. Před zahájením suplementace a po každém období 3 měsíců podávání vitaminů bylo provedeno stanovení markerů oxidačního stresu (SOD, GSH, GPx, AOC, MDA), hladina vitaminu E, HbA1c a glykovaný protein. Kontrolní skupinu tvořilo 14 dětí s T1DM, které terapii s vitaminy odmítly (6 dívek a 8 chlapců), průměrného věku 13,07±SD 4,57 let, průměrný HbA1c 9,64±SD 2,66% DCCT), glykovaný protein 296,6±88,7 umol/l, průměrné trvání choroby 2,2 roky. Všechny děti byly léčeny stejným intenzifikovaným inzulínovým režimem.

Výsledky a závěry studie 4.3.2. Děti s podávanou suplementací vitaminu E a C na konci roční studie jasně vykazaly signifikantně lepší kompenzaci DM (HbA1c  $p<0.05$  a glykovaný protein  $p<0.01$ ). Parametry oxidačního stresu byly také významně zlepšeny: SOD  $p<0.05$ , GSH  $p<0.01$ , toto zvýšení svědčilo pro zlepšení antioxidační obrany organismu. Stejně tak hladiny vitaminu E jako antioxidantu byly signifikantně vyšší na konci každé periody podávání. U kontrolní skupiny dětí bez suplementace nedošlo k podstatné změně HbA1c a druhý sledovaný parametr kompenzace glykovaný protein byl horší než na začátku studie ( $p<0.05$ ).

Studie 4.3.2. se také zabývala oxidačním poškozením DNA a možnostmi DNA reparace u dětí s T1DM. Oxidační poškození DNA ve studii bylo vyšší než u zdravých kontrol, ale nebyla zjištěná statistická významnost. Oxidační stres však stimuluje DNA reparaci opravující oxidační poškození DNA. S rostoucím věkem však intenzita tohoto procesu klesá a s tím může souviset snížená obrana pacientů s T1DM proti OS a vznik diabetických mikrovaskulárních komplikací V mladém organismu je tedy DNA reparační proces vyšší.



## 4.4. Diabetes mellitus typu 1 a gastrointestinální hormony v dětském věku

(komentář publikace)

### 4.4.1. Gut peptide hormones and pediatric type 1 diabetes mellitus

Huml M, Kobr J, Siala K, Varvarovska J, Pomahacova R, Karlikova M, Sykora J.  
*Physiological Research*, 2011, vol. 60, no. 4, p. 647-658. Epub 2011 May16.

Moderní strategie léčby T1DM se opírá o substituci inzulínu, která ale neodráží sekreční profil zdravých jedinců. Postprandiální hyperglykémie jsou u pacientů s T1DM častým problémem (100). Několik posledních let je intenzivně zkoumán vliv gastrointestinálních (GIT) peptidů na T1DM a jeho kompenzaci. Tyto působky ovlivňují jednak motilitu GIT (amylin; GIP- gastric inhibitory polypeptide, nověji glucose-dependent insulinotropic peptide; GLP-1- glucagon-like peptide 1; PYY- peptid YY), působí na produkci glukózy játry (amylin, ghrelin, PP- pankreatický polypeptid, GIP, GLP-1, PYY, leptin), inzulínovou sekreci (amylin, ghrelin, GIP, GLP-1, PP) či zvyšují přežití  $\beta$ -buněk pankreatu (GLP-1 a GIP). Amylin je produkován v pankreatu spolu s inzulínem v reakci na příjem stravy. Zvyšuje sekreci inzulínu, snižuje produkci glukózy játry, snižuje GIT motilitu, zpomaluje evakuaci žaludku a inhibuje sekreci glukagonu. To vše přispívá k normalizaci glykémie (101). U pacientů s T1DM je produkce amylinu snižena (102). Inkretiny (GIP a GLP-1) jsou produkovány v GIT traktu v reakci na příjem stravy, kdy zvyšují produkci inzulínu (GIP působí přes GIPR receptory; GLP-1 přes GLP-1 receptory), snižují produkci glukózy játry, snižují GIT motilitu a zpomalují evakuaci žaludku. V době lačnění jsou jejich hladiny nízké. Při hyperglykémii inzulinotropní účinek GIP klesá (103). Ghrelin je produkován v GIT traktu (žaludek). Jeho produkce stoupá v době lačnění a po jídle klesá. Zvyšuje produkci glukózy játry a snižuje produkci inzulínu. U pacientů s T1DM byly popsány nízké hladiny ghrelu a snížená odpověď v jeho produkci po požití stravy (104). Pro lepší pochopení složitých účinků jednotlivých digestivních hormonů ve vztahu k diabetu mellitu a jeho kompenzaci uvádíme souhrnně v tabulce 1. GIT hormony a hormony související s glukózovým metabolismem byly studovány na zvířecích i lidských modelech, avšak existuje množství metabolických pochodů a interakcí, které nejsou zcela objasněny. Několik studií

shrnuje role GIT hormonů u dospělých pacientů s T1DM (102). Kromě inzulínu se objevují i další hormony, u nichž dochází k depleci nebo k alteraci jejich sekrece v důsledku autoimunitní destrukce  $\beta$ -buněk pankreatu. Substituce některých z těchto GIT hormonů u T1DM dospělých pacientů vede ke zlepšení metabolické kontroly a kompenzace DM. Světová literatura neobsahuje dostatečné informace zabývající se GIT hormony ve vztahu k dětskému T1DM. Studie zabývající se GIT hormony z komplexního hlediska a z hlediska vzájemných interakcí několika hormonů jsou aktuálně nedostatečné a informace o vlivu úrovně kompenzace T1DM na hladiny GIT hormonů nejsou dle dostupné literatury vyčerpávající.

Cílem studie 4.4.1. bylo proto stanovit plazmatické hladiny vybraných GIT hormonů a hormonů souvisejících s metabolismem glukózy u pacientů s T1DM, kontrolní skupiny zdravých jedinců a u skupiny dětí s funkčními bolestmi břicha (FBB). Dalším cílem bylo posoudit vliv GIT hormonů na kompenzaci T1DM. Pomocí multiplexového kitu (LINCOPlex®) byly stanoveny hladiny amylinu, aktivního ghrelinu, aktivního GLP-1, GIP, inzulínu, leptinu, PP a PYY. Chtěla bych zdůraznit, že odběry biologického materiálu ke stanovení multiplexovou soupravou vyžadují těsnou spolupráci při odběru a následném rychlému transportu k laboratorní analýze. Hladiny stanovených GIT hormonů byly korelovány s plazmatickými hladinami GIT hormonů kontrolních skupin a s antropometrickými a biochemickými parametry. Celkem bylo analyzováno 440 hladin vybraných GIT hormonů u 55 jedinců. Vyšetřovaný soubor tvořilo 19 T1DM pacientů (průměrný věk: 13,4 roků), 21 jedinců kontrolní skupiny (průměrný věk: 13,4 roku) a 15 dětí sledovaných pro FBB (průměrný věk: 10,5 roku). Vstupní data byla hodnocena pomocí Wilcoxonova párového testu, závislosti mezi hladinami jednotlivých hormonů v obou skupinách byly testovány pomocí Spearmanova a Kendallova koeficientu pořadové korelace, také závislost mezi hladinou hormonů a biochemickými parametry. Následně signifikantní korelace byly podrobeny step-wise regresní analýze k odhalení možných nezávislých faktorů.

Výsledky a závěry studie 4.4.1. Studie prokázala, že stanovení hladin GIT hormonů použitím multiplexové metody se jeví jako velmi výhodné pro senzitivitu a efektivitu hodnocení výsledků. Potřeba minimálního objemu plazmy (25  $\mu$ l) k analýze umožňuje stanovit i několik desítek analytů najednou, což je prospěšné především v pediatrii. U skupiny T1DM pacientů byly nalezeny signifikantně nižší hladiny amylinu ( $p < 0.001$ ), ghrelinu ( $p < 0.05$ ) a C-peptidu ( $p < 0.001$ ), naopak hladina GIP ( $p < 0.05$ ) byla elevována v porovnání se zdravou populací. U skupiny T1DM se špatnou kompenzací byly zjištěny vysoce významné odchylky v hladinách GIT hormonů. Ghrelin ( $p < 0.001$ ) i GIP ( $p < 0.01$ ) byly signifikantně

odlišné od kontrolní skupiny. Hladiny ostatní sledovaných hormonů se statisticky nelišily v porovnání s kontrolní skupinou. Dále jsme stanovili hladiny amylinu, ghrelinu, GIP, GLP-1, leptinu, inzulínu, PP a PYY u FBB pacientů, kteří tvořili 2. kontrolní soubor. Hladiny hormonů dětí s FBB se signifikantně nelišily od zdravých kontrol. Naše výsledky hladin GIT hormonů dětí s FBB a zdravých kontrol ukázaly, jako jedny z prvních, že metabolismus T1DM hraje důležitou roli v sekreci GIT peptidů uplatňující se s velkou pravděpodobností v patofyziologických mechanismech u T1DM. Ve studii byl potvrzen vliv hormonů na kompenzaci T1DM. Byly nalezeny signifikantní korelace hodnoty HbA1c a dávkou inzulínu s hladinou ghrelinu. Tento vztah potvrzuje signifikantně nízká hladina ghrelinu u skupiny T1DM se špatnou kompenzací v porovnání se zdravou skupinou ( $p < 0.001$ ). Multivariatní regresní analýza potvrdila hodnotu HbA1c a dávku inzulínu jako nezávislé faktory pro hladiny ghrelinu ( $p < 0.01$ ). Naše výsledky ukázaly, že hodnota ghrelinu by mohla přispět k hodnocení kompenzace T1DM u dětí. Prokázané nízké hladiny amylinu u dětských T1DM pacientů potvrzují jeho deficit. U skupiny se špatnou kompenzací T1DM byla nalezena signifikantní korelace HbA1c a hladiny amylinu ( $p < 0.01$ ). Zařazení známého analogu amylinu do léčebného schématu T1DM by mohlo přispět ke zlepšení metabolické kontroly a kompenzace T1DM, což prozatím bylo potvrzeno pouze na dospělé populaci. Domníváme se však, že tato studie může sloužit jako výchozí bod pro další intervenční studie u T1DM v dětském věku. Výsledky prokázaly alterovanou sekreci vybraných GIT hormonů a hormonů souvisejících s metabolismem glukózy u dětských T1DM pacientů a také jejich vliv na denní potřebu inzulínu a metabolickou kontrolu nemoci. Průkaz odlišné sekrece GIT hormonů nám potvrdil, že inzulín není jediným hormonem, k jehož depleci dochází při autoimunitní destrukci pankreatických  $\beta$ -buněk. GIT hormony ukazují velký potenciál, jenž v budoucnu umožní hlubší pochopení patofyziologických dějů T1DM dětí. Pokud se podaří farmakologicky zasáhnout do metabolických pochodů GIT hormonů, pravděpodobně se nám podaří zlepšit i metabolickou kontrolu a snížit morbiditu dětských pacientů s T1DM.

**Tabula 1: Účinky GIT hormonů**

Účinek specifických GIT hormonů								
GIT hormon	Místo syntézy	GIT motilita	Evakuace žaludku	Produkce glukózy játry	Cirkulující hladiny hormonu		Inzulínová sekrece	Přežití populace B-buněk
					Nalačno	Postprandální		
Amylin	pankreas	↓	↓	↓	↓	↑	↑	-
Ghrelin	GIT	-	-	↑	↑	↓	↓	-
GLP-1	GIT	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑
GIP	GIT	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑
Inzulín	pankreas	-	-	↓	↓	↑	N/A	-
Leptin	tuková tkáň	-	-	↓	-	-	↑↓	-
Pankreatý polypeptid	pankreas	-	-	↓	↓	↑	↑	-
PYY	GIT	↓	↓	-	-	-	-	-

**Legenda:** ↑ - zvýšený účinku; ↓ - snížení účinku; **GIT** – gastrointestinální trakt; **N/A** – nelez aplikovat, **GIT** – gastrointestinální trakt

**5. ČÁST**  
**PORUCHY KALCIUM- FOSFÁTOVÉHO**  
**METABOLISMU**

## **5.1. Albrightova hereditární osteodystrofie; kožní a podkožní léze; pseudohypoparatyreóza typu Ia, pseudopseudohypoparatyreóza; klinická, histopatologická a molekulárně genetická studie 4 pacientů s touto diagnózou; nová mutace v *GNAS1* genu**

(komentář 1 publikace)

### **5.1.1. Cutaneous and superficial soft tissue lesions associated with Albright hereditary osteodystrophy: clinicopathological and molecular genetic study of 4 cases, including a novel mutation of the *GNAS* gene**

Kacerovska D, Nemcova J, Pomahacova R, Michal M, Kazakov DV.

*Am J Dermatopathol*, 2008 Oct; 30(5): 417-24. DOI: 10.1097/DAD.0b013e318180ec0e.

Albrightova hereditární osteodystrofie (AHO) je vzácný syndrom zahrnující kožní a podkožní léze (osteomy a kalcifikace), malou postavu, obezitu, kulatý obličej, brachymetakarpii, zkrácené IV. metakarpy a metatarzy. Může být přítomna mentální retardace, katarakta, zubní defekty a kalcifikace v bazálních gangliích (105,106). Pseudohypoparatyreóza typu Ia (PHPIa) a pseudopseudohypoparatyreóza (PPHP) jsou autozomálně dominantně dědičná onemocnění, způsobená inaktivační mutací v *GNAS1* genu, který kóduje  $\alpha$ -podjednotku proteinu G (107). Pacienti s PHPIa mají symptomy AHO a současně rezistenci k hormonům, které působí přes  $\alpha$ -podjednotku proteinu G. Typicky se jedná o rezistenci k TSH (tyreotropní hormon) s vývojem hypotyreózy a o rezistenci k parathormonu (PTH), která se projeví hypokalcémií, hyperfosfatémií při vysoké hladině PTH; byla popsána rezistence k růstovému hormonu a ke gonadotropinům (108). Pacienti s PPHP mají symptomy AHO bez hormonální rezistence (109).

Cílem práce 5.1.1 bylo demonstrovat klinicko-morfologickou a genetickou heterogenitu těchto onemocnění. Do studie byli zahrnuti 4 pacienti ze 2 rodin, kde matky jsou postiženy PPHP s klinickými příznaky AHO s kožními osteomy a jejich děti PHPIa s příznaky AHO a hormonální rezistencí (rezistence k TSH a k PTH). U obou rodin byla potvrzena mutace v *GNAS1* genu. K diagnóze PHPIa u 3leté dívky vedla progredující obezita, nápadně kulatý obličej, brachymetakarpie, drobné kožní a podkožní kalcifikace v oblasti stehna a paty. Laboratorně byla potvrzena primární hypotyreóza s elevací TSH 9,2 mIU/l

(norma 0,3-4), snížený fT4 (volný tyroxin) 7,61 pmol/l (norma 8-21,1), hypokalcémie 1,84 mmol/l (norma 2,2-2,6), hyperfosfatémie 2,64 mmol/l (norma 0,7-2,2), vysoká hladina parathormonu 822 pg/ml (norma 10-60), což při současné hypokalcémii svědčilo pro rezistenci k PTH. U matky dítěte byla stanovena diagnóza PPHP. Anamnesticky měla od dětství kožní a podkožní kalcifikace dlaně a zápěstí, zkrácený IV. metakarp, hormonální vyšetření neschválila pro hormonální rezistenci. U matky a dítěte byla potvrzena mutace v genu *GNAS1*, Q35X (c.103C>T) v exonu 1. K diagnóze PPHIa u 4letého chlapce vedl vývoj podkožních kalcifikací od 5. týdne života v oblasti končetin, břicha a kalvy. V klinickém obraze dále dominoval mikropenis, postupný vývoj obezity a nápadně kulatý obličej. Histopatologické vyšetření z provedené probatorní excise ze 2 různých kožních lézí potvrdilo diagnózu kožního osteomu. Osteomy byly tvořeny trabekulami lamelární kosti uložené v dermis a subkutis. Fokálním nálezem byly mnohoaderné osteoklasty a jen řídce byly trabekuly lemovány osteoblasty. Ve druhé biopsii byla velká část kosti ostře oddělena od sousedního kolagenu či tuku, zatímco na jiném místě biopsie byla kost ohraničena nezralými vřetenovitými či oválnými buňkami. Kostní trabekuly byly v této části lehce zakřiveny a obraz tak napodoboval fibrózní dysplazii. V 8 měsících věku byla u dítěte zjištěna primární hypotyreóza s mírnou elevací TSH a sníženou hladinou fT4, stejný obraz jako v případě naší první pacientky. V tomto věku byly parametry kalciového metabolismu v normě včetně hladiny PTH. Kontrolní vyšetření ve 4 letech věku již ukázalo vývoj hypokalcémie, hyperfosfatémie při vysoké hladině PTH, což potvrdilo rezistenci k PTH. Příčinou hypotyreózy byla tedy rezistence k TSH a s ohledem na přítomnost mikropenisu pravděpodobně rezistence ke gonadotropinům. U matky dítěte byla stanovena diagnóza PPHP. Od dětství měla podobné kožní léze na zádech a končetinách. Kožní excise s histopatologickým vyšetřením potvrdila diagnózu kožních osteomů. RTG vyšetření rukou prokázalo zkrácení IV. a V. metakarpu. Hormonální vyšetření neschválila pro hormonální rezistenci. U matky a dítěte byla potvrzena dosud nepopsaná mutace v genu *GNAS1*, E268X (c.802G>T) v exonu 10. 1 osteom a kalcifikující aponeurotické léze připomínající fibrom byla analyzována za použití human androgen receptor assay (HUMARA) a byl zkoumán klonální status, ve všech případech analyzovaných metodou HUMARA (2/2) byla zjištěna polyklonalita. Ve studii je popsáno mnohem větší spektrum lézí kůže a měkkých tkání než jsou obvykle popisovány v literatuře, což dále zpřesňuje zařazení již známých klinických variant AHO. Vedle osteomů v kůži a podkoží jsme identifikovali následující léze: kalcifikující aponeurotické léze upomínající na fibrom, léze připomínající cirkumskriptní kalcinózu a neobvyklé nevi s osteoidem a/nebo intranukleární pseudoinkluze.

Závěry práce 5.1.1. Naše výsledky ukazují, že příznaky AHO mohou být velmi heterogenní. U všech případů AHO by měla být provedena analýza genu *GNAS1* k určení mutace. U dětské obezity, primární hypotyreózy a u nejasné příčiny hypokalcemie je diferenciatně diagnosticky nutné zvažovat diagnózu pseudohypoparatyreózy. Hypokalcemie, hyperfosfatemie a vysoká hladina PTH jsou suspektní z PHP. Těžká hypokalcemie je emergentní, život ohrožující stav.



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AIS	androgene insensitivity syndrome
AIT	autoimunitní tyreoidida
ACTH	adrenokortikotropní hormon
AHO	Albrightova hereditární osteodystrofie
AMH	antimüllerický hormon
anti GAD	protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové
anti IA2	protilátky proti tyrozinofosfatáze
anti IRI	protilátky proti inzulinu
anti rTSH	protilátky proti receptorům pro TSH
anti TG	protilátky proti tyreoglobulinu
anti TPO	protilátky proti tyreoidální peroxidáze
AO	autoimunitní onemocnění
AOO	antioxidační ochrana organismu
APS	autoimunitní polyglandulární syndrom
BMI	body mass index
CAH	kongenitální adrenální hyperplazie
CAIS	complete androgene insensitivity syndrome
CD	Cushingova choroba
CRH	kortikoliberin
CS	Cushingův syndrom
DM	diabetes mellitus
FBB	funkční bolesti břicha
FNAB	fine needle aspiration biopsy
FSH	folikuly stimulující hormon
ft4	volný tyroxin
GB	Gravesova-Basedowova choroba
GCK	glukokináza
GCK-MODY	glukokinázový diabetes
GIP	gastric inhibitory polypeptide
GIT	gastrointestinální trakt
GLP-1	glucagon-like peptide 1

GPx	glutathionperoxidáza
GSH	glutathion
HbA1c	glykovaný hemoglobin
HNF-diabetes	diabetes transkripčních faktorů
IGF-1	inzulinu podobný růstový faktor 1 (insulin-like growth factor 1)
ivGTT	intravenózní glukózový toleranční test
JLT	juvenilní lymfocytární tyreoiditida
LGN	Leksellův gama nůž
LH	luteinizační hormon
LPS	lipopolysacharid
MEN	mnohočetná endokrinní neoplazie
MDA	malondialdehyd
MODY	dospělá forma diabetu u mladých (maturity-onset diabetes of the young)
oGTT	orální glukózový toleranční test
OS	oxidační stres
PAIS	partial androgene insensitivity syndrome
PHP	pseudohypoparatyreóza
PHPIa	pseudohypoparatyreóza typu Ia
PP	pankreatický polypeptid
PPHP	pseudopseudohypoparatyreóza
P450scc	enzym štěpící postranní řetězec cholesterolu
PTC	papilární karcinom štítné žlázy
PTH	parathormon
PYY	peptid YY
ROS	reaktivní formy kyslíku
SLE	systemový lupus erythematoses
SOD	superoxiddismutáza
StAR protein	steroidogenní akutní regulační protein
TC	karcinom štítné žlázy
T1DM	diabetes mellitus 1. typu
TRMA	thiamin-responzivní megaloblastická anemie
TSH	tyreotropní hormon
UC	ulcerózní kolitida

## SEZNAM CITACÍ

1. Brown RS. Autoimmune thyroiditis in childhood. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2013; 5 (Suppl 1): 45-9.
2. Feingold SB, Smith J, Houtz J, Popovsky E, Brown RS. Prevalence and functional significance of thyrotropin receptor blocking antibodies in children and adolescents with chronic lymphocytic thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 4742–4748.
3. Skarpa V, Kousta E, Tertipi A, Anyfandakis K, Vakaki M, Dolianiti M, Fotinou A, Papathanasiou A. Epidemiological characteristics of children with autoimmune thyroid disease. *Hormones (Athens)* 2011; 10(3): 207-14.
4. Feldt-Rasmussen U, Rasmussen AK. Autoimmunity in differentiated thyroid cancer: significance and related clinical problems. *Hormones (Athens)* 2010; 9(2): 109-117.
5. Mazokopakis EE, Tzortzinis AA, Dalieraki-Ott EI, Tsartsalis AN, Syros PK, Karefilakis CM, Papadomanolaki MG, Starakis IK. Coexistence of Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma. A retrospective study. *Hormones (Athens)* 2010; 9(4): 312-317.
6. Özen S, Berk Ö, Şimşek DG, Darcan S. Clinical course of Hashimoto's thyroiditis and effects of levothyroxine therapy on the clinical course of the disease in children and adolescents. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2011; 3(4): 192-7.
7. Radetti G, Gottardi E, Bona G, Corrias A, Salardi S, Loche S; Study Group for Thyroid Diseases of the Italian Society for Pediatric Endocrinology and Diabetes (SIEDP/ISPED) The natural history of euthyroid Hashimoto's thyroiditis in children. *J Pediatr* 2006; 149(6): 827–832.
8. Kakleas K, Soldatou A, Karachaliou F, Karavanaki K. Associated autoimmune diseases in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus (T1DM). *Autoimmun Rev* 2015; 14(9): 781-97.
9. Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Di Domenicantonio A, Fallahi P. Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmun Rev* 2015; 14(2): 174-80.
10. Fallahi P, Ferrari SM, Ruffilli I, Elia G, Biricotti M, Vita R, Benvenga S, Antonelli A. The association of other autoimmune diseases in patients with autoimmune thyroiditis: Review of the literature and report of a large series of patients. *Autoimmun Rev* 2016; 15(12): 1125-1128.
11. Głowińska-Olszewska B, Michalak J, Łuczyński W, Del Pilar Larosa M, Chen S, Furmaniak J, Smith BR, Bossowski A. Organ-specific autoimmunity in relation to clinical characteristics in children with long-lasting type 1 diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2016; 29(6): 647-56.
12. Dittmar M, Libich C, Brenzel T, Kahaly GJ. Increased familial clustering of autoimmune thyroid diseases. *Horm Metab Res* 2011; 43(3): 200-4.
13. Segni M, Wood J, Pucarelli I, Toscano V, Toscano R, Pasquino AM. Clustering of autoimmune thyroid diseases in children and adolescents: a study of 66 families. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001; 14(5): 1271-5.
14. Hayter SM, Cook MC. Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 2012; 11: 754-765.
15. Brown RS, Alter CA, Sadeghi-Nejad A. Severe unsuspected maternal hypothyroidism discovered after the diagnosis of thyrotropin receptor-blocking

- antibody-induced congenital hypothyroidism in the neonate: failure to recognize and implications to the fetus. *Horm Res Paediatr* 2015; 83(2): 132-5.
16. Lee JH, Kim Y, Choi JW, Kim YS. The association between papillary thyroid carcinoma and histologically proven Hashimoto's thyroiditis: a meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 2013; 168(3): 343-9.
  17. Liu X, Zhu L, Cui D, Wang Z, Chen H, Duan Y, Shen MP, Zhang ZH, Wang XD, Chen JW, Alexander EK, Yang T. Coexistence of Histologically Confirmed Hashimoto's Thyroiditis with Different Stages of Papillary Thyroid Carcinoma in a Consecutive Chinese Cohort. *Int J Endocrinol* 2014; 2014:769294. Published online 2014 Nov 18. doi:10.1155/2014/769294.
  18. Konturek A, Barczyński M, Wierchowski W, Stopa M, Nowak W. Coexistence of papillary thyroid cancer with Hashimoto thyroiditis. *Langenbecks Arch Surg* 2013 Mar; 398(3): 389-394.
  19. Iliadou PK, Effraimidis G, Konstantinos M, Grigorios P, Mitsakis P, Patakiouta F, Pazaitou-Panayiotou K. Chronic lymphocytic thyroiditis is associated with invasive characteristics of differentiated thyroid carcinoma in children and adolescents. *Eur J Endocrinol* 2015; 173(6): 827-33.
  20. Hay, J. E., Wiesner, R. H., Shorter, R. G., et al. Primary sclerosing cholangitis and celiac disease. A novel association. *Ann Intern Med* 1988, 109, s. 713-7.
  21. Hogberg, L., Falth-Magnusson, K., Grodzinsky, E., et al. Familial prevalence of coeliac disease, s. a twenty-year follow-up study. *Scand J Gastroenterol* 2003, 38, s. 61-5.
  22. Schuppan, D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000, 119, s. 234-42.
  23. Thomson, M., Kitching, P., Jones, A., et al. Are endoscopic biopsies of small bowel as good as suction biopsies for diagnosis of enteropathy? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999, 29, s. 438-41.
  24. Labate, A., Gambardella, A., Messina, D., et al. Silent celiac disease in patients with childhood localization-related epilepsies. *Epilepsia* 2001, 42, s. 1153-55.
  25. Malý, J., Krejsek, J., Pozler, O. Biologická léčba nespecifických střevních zánětů. Protilátka proti TNF-alfa-infliximab v dětském věku. *Česko-Slovenská pediatrie*, č. 8, 2003, s. 507-514.
  26. Malmusi, M., Manca, V., Girolomoni, G. Coexistence of dermatitis herpetiformis, gluten-senzitive enteropathy, and ulcerative colitis. *J Am Acad Dermatol* 1994, 31, s. 1050-1.
  27. Halstensen, T., Mollnes, T. E., Garred, P., et al. Epithelial deposition of immunoglobulin G1 and activated complement (C3b and terminal complex) in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1990, 98, s. 1264-71.
  28. Visakorpi, J. K., Mäki, M. Changing clinical features of coeliac disease. *Acta Paediatr*, Suppl 395, 1994, s. 10-13.
  29. Sýkora, J., Varvařovská, J., Stožický, F., et al. Orgánově specifické protilátky u dětí s idiopatickými střevními záněty a jejich užití v klinické praxi. *Čas Lék Čes* 2000, 139, s. 735-37.
  30. Collin, P., Mäki, M., Keyriläinen, O., et al. Selective IgA deficiency and coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 1992, 27, s. 367-71.
  31. Arato, A., Korner, A., Veres, G., et al. Frequency of coeliac disease in Hungarian children with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Pediatr* 2003, 162, s. 1-5.
  32. Monsen, U., Bernell, O., Johansson, C., et al. Prevalence and incidence of

- inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1991, 26, s. 302-6.
33. Arnola, T., Mustalahti, K., Saha, M. T., et al. Celiac disease, thyreotoxikosis, and autoimmune hepatitis in a child. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002, 35, s. 90-92.
  34. Meloni, G. F., Tomasi, P. A., Bertocelli, A., et al. Prevalence of silent celiac disease in patients with autoimmune thyroididits from Northern Sardinia. *J Endocrinol Invest* 2001, 24, s. 298-302.
  35. Volta, U., Ravaglia, G., Grantino, A., et al. Coeliac disease in patients with autoimmune thyroiditis. *Digestion* 2001, 64, s. 61-5.
  36. Amoroso, A., Garzia, P., Vadacca, M., et al. The unusual association of three autoimmune diseases in a patient with Noonan syndrome. *J Adolesc Health* 2003, 32, s. 94-97.
  37. Gonc, E. N., Ozon, A., Alikasifoglu, A., et al. Type 1 diabetes mellitus in a 3 1/2 year-old girl with Turner's syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002, 15, s. 1203-6.
  38. Acquaviva, A., Municchi, G., Marconcini, S., et al. Celiac disease in a patient with  $\beta$ -thalassemia major. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003, 36, s. 489-90.
  39. Lepore, L., Martelossi, S., Pennesi, M., et al. Prevalence of celiac disease in patients with juvenile chronic arthritis. *J Pediatr* 1996, 129, s. 311.
  40. Zachor, D. A., Mroczek-Musulman, E., Brown, P. Prevalence of celiac disease in Down syndrome in the United States. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000, 31, s. 275-79.
  41. Dohil, R., Hassall, E., Jevon, G., et al. Gastritis and gastropathy of childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999, 29, s. 678-694.
  42. Carroccio, A., Iacone, G., Lerro, P., et al. Role of pancreatic impairment in growth recovery during gluten free diet in childhood celiac disease. *Gastroenterology* 1997, 112, s. 1839.
  43. Wurm, P., Dixon, A. D., Rathbone, B. J. Ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis and coeliac disease, two cases and review of the literature. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003, 15, s. 815-7.
  44. Mody, R. J., Brown, P. I., Wechsler, D. S. Refractory iron deficiency anemia as the primary clinical manifestation of celiac disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003, 25, s. 169-72.
  45. Bostwick, H., Berezin, S., Halata, M., et al. Celiac disease presenting with microcephaly. *J Pediatr* 2001, 138, s. 589-92.
  46. Habior, A., Rawa, T., Orłowska, J., et al. Association of primary sclerosing cholangitis, ulcerative colitis and coeliac disease in female siblings. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002, 14, s. 789-91.
  47. Volta, U., De Franceschi, L., Lari, F., et al. Coeliac disease hidden by cryptogenic hypertransaminasemia. *Lancet* 1998, 35, s. 26.
  48. Savilahti, E., Arato, A., Verkasalo, M. Intestinal gamma/delta receptor-bearing T lymphocytes in celiac disease and inflammatory bowel disease in children. Constant increase in celiac disease. *Pediatr Res* 1990, 28, s. 579-81.
  49. Gillberg, R., Dotevall, G., Ahren, C. Chronic inflammatory bowel disease in patients with coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 1982, 17, s. 491-6.
  50. Kitis, G., Holmes, G. K., Cooper, B. T., et al. Association of coeliac disease and inflammatory bowel disease. *Gut* 1980, 21, s. 636-41.
  51. Kumar, P. J., O'Donoghue, D. P., Gibson, J., et al. The existence of

- inflammatory bowel lesions in gluten-sensitive enteropathy. *Postgrad Med J* 1979, 55, s. 753-6.
52. Casella, G., Perego, D., Baldini, V., et al. A rare association between ulcerative colitis (UC), celiac disease (CD), membranous glomerulonephritis, leg venous thrombosis, and heterozygosity for factor V Leiden. *J Gastroenterol* 2002, 37, s. 761-2.
  53. Choy, M. Y., Walker-Smith, J. A., Williams, C. B., et al. Differential expression of CD25 (interleukin-2 receptor) on lamina propria T cells and macrophages in the intestinal lesions in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 1990, 31, s. 1365-70.
  54. Day, A. S., Abbott, G. D. Simultaneous presentation of coeliac disease and ulcerative colitis in a child. *Paediatr Child Health* 1999, 35, s. 204-6.
  55. Sood, A., Midha, V., Sood, N., et al. Coexistence of celiac disease and ulcerative colitis. *Indian J Gastroenterol* 2001, 20, s. 200-1.
  56. Shah, A., Mayberry, J. F., Williams, G., et al. Epidemiological survey of coeliac disease and inflammatory bowel disease in first-degree relatives of coeliac patients. *Q J Med* 1990, 74, s. 283-8.
  57. Collin, P., Syrjanen, J., Partanen, J., et al. Celiac disease and HLA DQ in patients with IgA nephropathy. *Am J Gastroenterol* 2002, 97, s. 2572-6.
  58. Schuppan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000; 119: 234–242.
  59. Ventura, A., Neri, E., Ughi, C., et al. Gluten-dependent diabetes-related and thyroid-related autoantibodies in patients with celiac disease. *J Pediatr* 2000, 137, s. 263-5.
  60. da Rosa Utiyama, S. R., da Silva Kotze, L. M., Nisihara, R. M., et al. Spectrum of autoantibodies in celiac patients and relatives. *Dig Dis Sci* 2001, 46, s. 2624-30.
  61. Lu H, Hsu PI, Graham DY, Yamaoka Y. Duodenal ulcer promoting gen of *Helicobacter pylori* *Gastroenterology* 2005; 128: 833– 48
  62. Ebrahimipour S, Esmaeili H, Ghadimi R. Food bioactive componts, a possible adjuvant for H. pylori eradication *Caspian J. Intern. Med.*, 8 (2017), pp. 131-132
  63. Ozen, A, Ertem, D, Pehlivanoglu, E. Natural history and symptomatology of *Helicobacter pylori* in childhood and factors determining the epidemiology of infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 398-404
  64. Burri, E, Beglinger, C. The use of fecal calprotectin as a biomarker in gastrointestinal disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; 8: 197-210.
  65. Alzahrani S, Lina TT, Gonzalez J, Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol.* 2014 ; 20(36): 12767-80.
  66. Bagheri N, Salimzadeh L, Shirzad H. The role of T helper 1-cell response in *Helicobacter pylori*-infection. *Microb Pathog.* 2018; 123: 1-8.
  67. Amedei A, Bergman MP, Appelmelk BJ et al. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* antigens and H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - adenosine triphosphatase in human gastric autoimmunity. *J Exp Med.* 2003; 198(8): 1147-56.
  68. Chmiela M, Gonciarz W Molecular mimicry in *Helicobacter pylori* infections. *World J Gastroenterol.* 2017; 23 (22): 3964-3977.
  69. Helgeland H, Flagstad G, Grotta J, et al. Diagnosing pediatric functional

- abdominal pain in children (4-15 years old) according to the Rome III criteria: results from a Norwegian prospective study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 49: 309-15.
70. Bens S, Mohn A, Yuksel B, Kulle AE et al. Congenital Lipoid adrenal hyperplasia: Functional characterization of three novel mutations in the StAR gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 1301-8.
  71. Chan Jong Kim. Congenital lipoid adrenal hyperplasia. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2014; 19(4): 179–183.
  72. Miller WL. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1771: 663-676.
  73. Tajima T, Fujieda K, Kouda N, Nakae J et al. Heterozygous mutation in the cholesterol side chain cleavage enzyme (P450scc) gene in patient with 46, XY sex reversal and adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3820-3825.
  74. Kim CJ, Lin L, Juany N, Quigley CA et al. Severe combined adrenal and gonadal deficiency caused by novel mutations in the cholesterol side chain cleavage enzyme, P450scc. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93 (3): 696-702.
  75. Baker BY, Lin L, Kim CJ, Raza L, Smith CP et al. Nonclassic congenital lipoid adrenal hyperplasia: a new disorder of the steroidogenic acute regulatory protein with very late presentation and normal male genitalia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4781-4785.
  76. Storr HL, Savage MO. Management of endocrine disease: Paediatric Cushing's syndrome *Eur J Endocrinol*. 2015, 173(1): R35-45.
  77. Savage MO, Dias RP, Chan LF, Afshar F, Plowman NP, Matson M, Grossman AB, Storr HL. Diagnosis and treatment of Cushing's disease in children. *Endocr Dev*. 2010, 17:134-45.
  78. Asuzu D, Chatain GP, Hayes C, Benzo S, McGlotten R, Keil M, et al. Normalized Early Postoperative Cortisol and ACTH Values Predict Nonremission After Surgery for Cushing Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017, 102(7):2179-2187
  79. Kochar IS, Ramachandran S, Sethi A. A variable course of Cushing's disease in a 7 year old: diagnostic dilemma. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2018, 31(11): 1285-1288
  80. Vitale G , Tortora F, Baldelli R, Cocchiara F, Paragliola RM, et al. Pituitary magnetic resonance imaging in Cushing's disease. *Endocrine*. 2017, 55(3): 691-696.
  81. Achermann JC, Hughes IA. Disorders of sex development. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, eds. *Williams Textbook of Endocrinology*, 12th ed. Philadelphia, Saunders Elsevier 2011; chapter 23.
  82. Galani A, Kitsiou-Tzeli S, Sofokleous CH, Kanavakis E, Kalpini-Mavrou A. Androgen insensitivity syndrome: clinical features and molecular defects. *Hormones* 2008; 7(3): 217-229.
  83. Khan S, Mannel L, Koopman CL, Chimpiri R, Hansen KR, Craig LB. The Use of MRI in the pre-surgical evaluation of patients with androgen insensitivity syndrome. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2014; 27: 17-20.
  84. Tank J, Knoll A, Gilet A, Kim S. Imaging characteristics of androgen insensitivity syndrome. *Clinical Imaging*. 2015; 39: 707-710.
  85. Hughes IA, Davies JD, Bunch TI, Pasterski V, Mastroyannopoulou K,

- MacDougall J. Androgen insensitivity syndrome. *The Lancet*. 2012; 380: 1419-28.
86. Boehmer AL, Brinkmann O, Brüggewirth H, van Assendelft C, Otten BJ, Verleun-Mooijman MC, Niermeijer MF, Brunner HG, Rouwé CW, Waelkens JJ, Oostdijk W, Kleijer WJ, van der Kwast TH, de Vroede MA, Drop SL. et al. Genotype versus phenotype in families with androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 4151-60
87. Bergmann AK, Sahai I, Falcone JF, Fleming J, Bagg A, Borgna-Pignati C, Casey R, Fabris L, Hexner E, Mathews L, Ribeiro ML, Wierenga KJ, Neufeld EJ: Thiamine-responsive megaloblastic anemia: Identification of novel compound heterozygotes and mutation update. *J Pediatr* 2009; 155: 888-892 e881.
88. Aycan Z, Bas VN, Cetinkaya S, Agladioglu SY, Kendirci HN, Senocak F: Thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome with atrial standstill: A case report. *J Pediatr Hematol Oncol* 2011; 33: 144-147.
89. Srikrupa NN, Meenakshi S, Arokiasamy T, Murali K, Soumittra N: Leber's congenital amaurosis as the retinal degenerative phenotype in thiamine responsive megaloblastic anemia: A case report. *Ophthalmic Genet* 2014; 35: 119-124.
90. Xian X, Liao L, Shu W, Li H, Qin Y, Yan J, Luo J, Lin FQ. A novel mutation of SLC19A2 in a chinese Zhuang ethnic family with thiamine-responsive megaloblastic anemia. *Cell Physiol Biochem*. 2018; 47(5): 1989-1997
91. Labay V, Raz T, Baron D, Mandel H, Williams H, Barrett T, Szargel R, McDonald L, Shalata A, Nosaka K, Gregory S, Cohen N: Mutations in slc19a2 cause thiamine-responsive megaloblastic anaemia associated with diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet*. 1999; 22: 300-304.
92. Anik A, Çatlı G, Abacı A, Böber E. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2015, 28(3-4): 251-63
93. Colclough K, Bellanne-Chantelot C, Saint-Martin C, Flanagan SE, Ellard S. Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha and 4 alpha in maturity-onset diabetes of the young and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum Mutat*. 2013, 34(5): 669-85.
94. Kyithar MP, Bacon S, Pannu KK, Rizvi SR, Colclough K et al. Identification of HNF1A-MODY and HNF4A-MODY in Irish families: phenotypic characteristics and therapeutic implications. *Diabetes Metab*. 2011, 37(6): 512-9.
95. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon W.L. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitu. *Biochemical Pharmacology*. 1998, 15: 1139-1149.
96. Holeček V, Racek J. The significance of free radicals and glycosylation end-products (AGE) in diabetes mellitus. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 3: 18-22.
97. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*. 1996, 19: 257-67.
98. Asayama K, Uchida N, Hayashibe H, Dobashi K, Amemiya S, Kato K, et al. Antioxidants in the serum of children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med*. 1993; 15: 597-602.
99. Racek J. Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. 1. vydání, Praha, Galén 2003, s. 89.
100. Kiess W, Kapellent T, Siebler T, Dost A, Deutscher J, Nietzsche U.



- Improvements and new potentials in pharmacological therapy of diabetes mellitus in children and adolescents. *Horm Res.* 1998; 50: 87-90.
101. Panagiotidis GA. Homologous islet amyloid polypeptide: effects on plasma levels of glucagon, insulin and glucose in the mouse. *Diabetes Res Clin Pract.* 1992; 18: 167-171.
102. Heptulla RA, Rodriguez LM, Kimberly JM, Haymond MW. Gastric emptying and postprandial glucose excursions in adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes.* 2008; 9: 561-566.
103. Lynn FC, Nathalie P, Eddy HC, Christopher HS, Mcinto SH, Kieffer TJ, Pederson RA. Defective glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor expression in diabetic fatty Zucker rats. *Diabetes.* 2001; 50: 1004-1011.
104. Martos-Moreno, Barrios V, Soriano-Guillén L, Argente J. Relationship between adiponectin levels, acylated ghrelin levels, and short-term body mass index changes in children with diabetes mellitus type 1 at diagnosis and after insulin treatment. *Eur J Endocrinol.* 2006; 155: 757-761.
105. Gomes MF, Camargo AM, Sampaio TA, et al. Oral manifestations of Albright hereditary osteodystrophy: a case report. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 2002; 57: 161-166.
106. Kapoor S, Gogia S, Paul R, et al. Albright hereditary osteodystrophy. *Indian J Pediatr.* 2006; 73: 153-156.
107. Bastepe M. The GNAS locus and pseudohypoparathyroidism. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 626: 27-40.
108. Lania A, Mantovani G, Spada A. G protein mutations in endocrine diseases. *Eur J Endocrinol.* 2001; 145: 543-559.
109. Bastepe M, Juppner H. GNAS locus and pseudohypoparathyroidism. *Horm Res.* 2005; 63: 65-74.

## PODĚKOVÁNÍ

*Prof. MUDr. Josefu Sýkorovi, Ph.D.*

*Prof. MUDr. Františku Stožickému, CSc.*

*Prof. MUDr. Jiřímu Kobrovi, Ph.D.*

*Doc. MUDr. Janě Varvařovské, Ph.D.*

*Prof. MUDr. Jiřímu Šolcovi, CSc.*

*Univerzitě Karlově v Praze, Lékařské fakultě v Plzni*

*Svým spolupracovníkům Dětské kliniky Fakultní nemocnice v Plzni*

*Pracovní skupině dětské endokrinologie*

*Své rodině a nejbližším*

Autor souhlasí se zapůjčením práce.

MUDr. Renata Pomahačová, Ph.D.

V Plzni dne 2.5.2019

