1. Souhrn

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

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

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

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

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

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

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

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

zablokování štítné žlázy u plodu s vývojem přechodné formy kongenitální hypotyreózy, kterou můžeme potvrdit vyšetřením TSH z pupečníkové krve a časněji nasadit substituční terapii levothyroxinem ještě před znalostí screeningu kongenitální hypotyreózy. Tyto ženy v průběhu gravidity musí mít adekvátní substituční terapii levothyroxinem, protože plod je plně závislý po celou dobu gravitidy na saturaci tyroxinem od matky.

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

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

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

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

1.3. Třetím cílem studie bylo posouzení imunologické reaktivity pacientů s juvenilní lymfocytární thyreoiditidou *H. pylori* pozitivních, negativních a u zdravých kontrol *H. pylori* pozitivních a negativních.

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

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

33 pacientů *H. pylori* negativních) průměrného věku 15 let (rozmezí 7-26 let) a kontrolní skupina 40 zdravých dívek (20 dívek *H. pylori* pozitivních, 20 *H. pylori* negativních) ze stejné socioekonomické skupiny s průměrným věkem 15 let (rozmezí 7-26 let). Imunologická reaktivita k lyzátu *H. pylori* a LPS se lišila mezi studovanými skupinami.

Jedinci s pozitivní infekcí *H. pylori* (JLT *H. pylori* pozitivní i zdravé kontroly *H. pylori* pozitivní) vykazovali masivní chemokinovou odpověď na stimulaci krevních mononukleárních buněk lyzátem *H. pylori* i jeho lipopolysacharidem. Pacienti JLT *H.pylori* pozitivní produkují po stimulaci prozánětlivé cytokiny, zejména IL-6.

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

Jedinci JLT *H. pylori* negativní měli vyšší produkci TGF-β po stimulaci LPS ve srovnání se zdravými kontrolami *H. pylori* pozitivními, stejně tak ve srovnání s jedinci JLT *H. pylori* pozitivními. IL-10 jako další regulační Th3 cytokin byl u skupiny zdravých kontrol *H. pylori* negativních spíše snížen, stejně jako produkce IL-5.

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

Uvedené testy tedy potvrdily významný vliv infekce *H. pylori* na imunokompetentní buňky, a to zejména v případě jedinců s autoimunitní dispozicí a tudíž přítomnou imunologickou dysbalancí. Stoupající incidence autoimunitních onemocnění včetně juvenilní lymfocytární thyreoiditidy vyžaduje jak komplexní péči o tyto pacienty s cíleným vyhledáváním možných sdružených autoimunitních onemocnění, tak vyhledávání možných spouštěcích faktorů této imunopatologické reakce. Budou nezbytné další studie vztahu mezi infekcí *H.pylori* a rozvojem autoimunitních onemocnění. Na podkladě našich zjištění doporučujeme cíleně pátrat u pacientů s autoimunitní thyreoiditidou po infekci *H. pylori* a v případě pozitivity infekci eradikovat.

2. Summary

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

We confirmed high frequency of autoimmune diseases in parent or grandparent of our patients with JLT (44,6%), which confirms genetic disposition to autoimmune immunopathological reaction in such affected families. At the time of JLT diagnosis, 59% of children had already hypofunction of the thyroid gland, 46% of which had severe hypothyroidism with myxoedema , bradycardia, hypotension, growth retardation. In several cases, the affected children were from families with unambiguous genetic disposition to autoimmune diseases. This fact leads to the question of the follow-up of individuals in these affected families due to possible development of autoimmune disease. A late diagnosis of severe primary hypothyroidism in childhood can have permanent aftereffects on the growth and development of the child.

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

The associated autoimmune disease was present in 15,2% of patients in our group. In 5,5% of the cases, another autoimmune disease of non-endocrine organs was first diagnosed, and then after several years was established the diagnosis of JLT with hypofunction of the thyroid gland. We recommend consequent searching out JLT in patients with other autoimmune disease and the follow-up of the development of organ specific autoantibodies in patients with diagnosis of more autoimmune diseases in order to make an early diagnosis of pre-clinical period of serious endocrinopathy such as autoimmune adrenalitis or type 1 diabetes mellitus.

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

After isolation of PBMC from the peripheral blood of the studied inviduals by Ficoll density gradient centrifugation, their immunoreactivity was analysed by determination of basal cytokine and chemokine production and after stimulation with *H.pylori* and its lipopolysaccharide (Lewis antigens) using the method of protein microarray. We analysed the production of 23 cytokine and chemokine. We examined 53 patients with JLT (20 patients *H.pylori* positive, 33 patients *H.pylori* negative) of average age of 15 years (range 7-26 years) and a control group of 40 healthy girls (20 girls *H. pylori* positive, 20 girls *H. pylori*

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

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

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

H. pylori negative patients had a higher production of TGF-β to LPS stimulation in comparison to *H.pylori* positive healthy controls, as well as in comparison to JLT *H.pylori* positive patients. The production of IL -10 as another regulatory Th3 cytokine was in *H.pylori* negative healthy controls rather decreased, as well as the production of IL-5.

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

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