Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka

MUDr. Vít Neuman

Efekt bezlepkové diety na zbytkovou kapacitu β-buněk, imunitní funkci a střevní mikrobiom dětí s nově manifestovaným diabetem 1. typu

The effect of gluten-free diet on β-cell residual capacity, immune function and gut microbiome in children with newly diagnosed type 1. diabetes

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Zdeněk Šumník, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne 19. 04. 2021

Vít Neuman

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli prof. MUDr. Zdeňkovi Šumníkovi, Ph.D. za skvělé odborné vedení mé práce i celého postgraduálního studia, za přátelský a obětavý přístup, podporu i cenné rady při řešení jakýchkoliv problémů. Děkuji prof. MUDr. Ondřeji Cinkovi, Ph.D. za pomoc při studiu metod zpracování a analýzy střevního mikrobiomu, bezchybnou spolupráci i přátelskou atmosféru, která v laboratoři pod jeho vedením vždy panuje.

Dík patří též kolektivům Oddělení dětské endokrinologie a diabetologie a Laboratoře molekulární genetiky Pediatrické kliniky 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy za vytvoření příjemného pracovního prostředí a spolupracovníkům ze 3. lékařské fakulty FN Královské Vinohrady a Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky.

Děkuji rovněž dětem s diabetem 1. typu a jejich rodinám, jež se účastnily experimentální části našeho projektu za trpělivost a ochotu.

V neposlední řadě děkuji své rodině a blízkým, bez jejichž pomoci a podpory by tato práce nemohla vzniknout.

Identifikační záznam

NEUMAN, Vít. *Efekt bezlepkové diety na zbytkovou kapacitu β-buněk, imunitní funkci a střevní mikrobiom u dětí s nově manifestovaným diabetem 1. typu. [The effect of gluten-free diet on β-cell residual capacity, immune function and gut microbiome in children with newly diagnosed type 1 diabetes]*. Praha, 2021. 92 stran. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Pediatrická klinika 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Motol. Školitel Prof. MUDr. Zdeněk Šumník, Ph.D.

Efekt bezlepkové diety na zbytkovou kapacitu β-buněk, imunitní funkci a střevní mikrobiom dětí s nově manifestovaným diabetem 1. typu

Abstrakt

Patofyziologické mechanismy ovlivňující vznik diabetu 1. typu (T1D) a rychlost jeho progrese krátce po diagnóze jsou dosud neznámé. Mezi kandidátní environmentální faktory spolurozhodující o vzniku a průběhu T1D patří i lepek, jež je znám svými prozánětlivými účinky.

Cílem dizertační práce bylo posoudit vliv bezlepkové diety (GFD) na zbytkovou kapacitu β-buněk, kompenzaci T1D, střevní mikrobiom, střevní propustnost, subtypy imunitních buněk u dětí s nově diagnostikovaným T1D a vliv přenosu střevního mikrobiomu na incidenci diabetu u bezmikrobních neobézních diabetických (NOD) myší.

Na skupině 45 dětí s nově diagnostikovaným T1D (26 intervenční skupina, 19 kontrolní skupina) jsme prokázali asociaci mezi dodržováním GFD a zpomalením rychlosti ztráty zbytkové kapacity β-buněk (rozdíl v trendu poklesu C-peptidu 409 pmol/l/rok; p = 0,04) a nižším HbA_1c (7,8 mmol/mol, p=0,02). Popsali jsme také taxony bakterií, jejichž četnost se po zavedení GFD změnila a prokázali změny v zastoupení některých subtypů regulačních i efektorových lymfocytů. Na střevní propustnost naopak zavedení GFD vliv nemělo. Na animálním modelu jsme rovněž prokázali, že přenesení lidského střevního mikrobiomu bezmikrobním NOD myším vede ke snížení incidence diabetu.

Podali jsme komplexní pohled na metabolické změny, které jsou u dětí s T1D asociovány s vyloučením lepku ze stravy. Svými výsledky jsme prohloubili znalosti o účincích lepku na lidský organizmus.

Klíčová slova: bezlepková dieta, diabetes 1. typu, střevní mikrobiom, střevní propustnost, zbytková kapacita β-buněk

The effect of gluten-free diet on β-cell residual capacity, immune function and gut microbiome in children with newly diagnosed type 1. diabetes

Abstract

The pathophysiology of the onset and progression of type 1 diabetes (T1D) is not fully understood. Gluten has a proinflammatory effect on the immune system and is therefore considered as one of the factors affecting the onset and progression of T1D.

The aim of the thesis is to allow a complex insight into the role of the GFD on the residual β-cell capacity, T1D control, gut microbiome, gut permeability, subtypes of immune cells and the effect of gut microbiome transfer into germ-free non-obese diabetic (NOD) mice on the incidence of diabetes.

On the group of 45 children with T1D (26 intervention group, 19 control group) we proved the association of the GFD with slower decrease of β-cell residual capacity (the difference in the trend of C-peptide decrease 409 pmol/l/year; p = 0,04) and lower HbA_1c (by 7,8 mmol/mol; p=0,02). We also described the changes in the gut bacteria that were differentially abundant after the administration of the GFD and the changes in abundance of the regulatory and effector immune cells. We showed there was no change in the gut permeability with respect to the study group. We also proved that the transfer of human gut microbiota to germ-free non-obese diabetic mice leads to the decrease in the incidence of diabetes in these mice.

Altogether, we offered a complex insight into a number of changes that are associated with the initiation of the GFD in children with T1D and thus extended the knowledge of the effects of gluten on the human body.

Key words: gluten-free diet, gut permeability, human gut microbiome, type 1 diabetes mellitus, residual β-cell capacity

Obsah

1. ÚVOD 11

2. DIABETES 1. TYPU 12

2.1. Charakteristika diabetu 1. typu 12
2.2. Epidemiologie diabetu 1. typu 12
2.3. Příčiny vzniku diabetu 1. typu 13
2.3.1. Genetické determinanty vzniku diabetu 1. typu 13
2.3.2. Environmentální determinanty vzniku diabetu 1. typu 14
2.4. Patogeneze diabetu 1. typu 15
2.5. Strategie prevence a terapie diabetu 1. typu 17
2.5.1. Strategie prevence diabetu 1. typu 17

3. LEPEK A DIABETES 1. TYPU 18

3.1. Složení a biochemické vlastnosti lepku 18
3.2. Animální studie vlivu lepku na T1D 19
3.3. Humánní studie vlivu lepku na T1D 19
3.3.1. Lepek před rozvojem autoimunity 19
3.3.2. Lepek a probíhající autoimunita 20
3.3.3. Lepek a manifestní T1D 20

4. STŘEVNÍ MIKROBIOM A DIABETES 1. TYPU 21

4.1. Střevní mikrobiom člověka 21
4.2. Studie na zvířecích modelech 21
4.3. Střevní mikrobiom a T1D 22
4.3.1. Bakterie asociované s rozvojem diabetu 1. typu 22
4.3.2. Bakterie asociované s ochranou proti diabetu 1. typu 23
4.3.3. Vliv lepku a GFD na střevní mikrobiom 24

5. STŘEVNÍ PROPUSTNOST A DIABETES 1. TYPU 24

6. IMUNITA A DIABETES 1. TYPU 26

6.1. Role imunitních buněk v patogenezi T1D 26
6.2. Lepek a imunitní systém 27

7. HYPOTÉZA A CÍLE POSTGRADUÁLNÍHO STUDIA 29

7.1. Hypotéza 29
7.2. Cíle vědecké práce 29

8. METODIKA 30

8.1. Pacienti a design studie 30
8.2. Průběh studie a sledované parametry 34
8.2.1. Protokol studie a studijní návštěvy 34
8.2.2. Hodnocení zbytkové kapacity β-buněk a kompenzace T1D 36
8.2.3. Hodnocení kvality života pacientů ve studii 36

8.2.4. Kontrola dodržování bezlepkové diety a rozbor jídelníčků 36
8.2.5. Sběr vzorků stolice a analýza složení střevního mikrobiomu 37
8.2.6. Vyšetřování střevní propustnosti 37
8.2.7. Analýza subpopulací T-lymfocytů 38
8.2.8. Přenos lidského střevního mikrobiomu do GF NOD myší 40
8.3. Statistická analýza 43

9. VÝSLEDKY 44

9.1. Zbytková kapacita β-buněk 45
9.2. Metabolická kompenzace, dávka inzulinu a IDAA1c 46
9.3. Dodržování bezlepkové diety, rozbor jídelníčků a dotazníky kvality života.. 47
9.4. Kontinuální monitoring glykémií 51
9.5. Složení střevního mikrobiomu před a během intervence GFD 52
9.6. Změny mikrobiomu po zavedení GFD 55
9.7. Střevní propustnost 60
9.8. Rozdíly v subpopulacích T-lymfocytů 62
9.9. Přenos lidského střevního mikrobiomu do GF NOD myší 65
9.9.1. Incidence diabetu 65
9.9.2. Složení přeneseného mikrobiomu 65
9.9.2. Inzulitida a T-regulační lymfocyty 68

10. DISKUZE 72

11. ZÁVĚR 78

12. SOUHRN 80

13. SUMMARY 81

14. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 82

15. PŘÍLOHA Č. 1 – SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA 92

Seznam zkratek použitých v textu

AG	průměrná glykémie
ATP	adenosintrifosfát
AUC	plocha pod křivkou
anti-tTG2	protilátky proti tkáňové transglutamináze typu 2
BBDP	BioBreeding potkani náchylní k diabetu
BMI	body mass index
CGM	kontinuální monitoring glykémie
CI	interval spolehlivosti
CV	variační koeficient (glykémií)
EMA	protilátky proti endomysiu
GADA65	protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové izoformě 65kDa
GIP	imunogenní peptidy lepku
GF	bezmikrobní (NOD myši)
GFD	bezlepková dieta
GLP-1	glukagon-like peptid 1
HbA1c	glykovaný hemoglobin
HLA	lidské antigeny leukocytů
IA2A	protilátky proti tyrosin-fosfatáze IA2
IAA	protilátky proti inzulinu
ICA	protilátky proti buňkám Langerhansových ostrůvků
IDAA1c	inzulinová dávka adjustovaná na vykovaný hemoglobin
IL-10	interleukin 10
LPS	lipopolysacharidy

MMTT	test smíšenou stravou
NOD	neobézní diabetické (myši)
PBMCs	mononukleární buňky z periferní krve
PBS	fosfátový pufr
QoL	kvalita života
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem
SD	směrodatná odchylka
T1D	diabetes 1. typu
TEMRA	terminálně diferencované efektorové paměťové CD4+ T-lymfocyty
ZnT8A	protilátky proti zinkovému transportéru ZnT8

1. Úvod

Diabetes 1. typu (T1D) je chronické autoimunitní onemocnění charakterizované progresivní ztrátou β-buněk slinivky břišní vedoucí k trvalé závislosti na podávání exogenního inzulinu. Celosvětově stoupající incidence a prevalence T1D přináší značnou zátěž zdravotní, ale také socioekonomickou, nalezení preventivních opatření proto patří mezi klíčové úkoly současné diabetologie i medicíny. Zatímco na poli genetických příčin T1D přinesly moderní molekulárně genetické technologie v posledních dvou dekádách značný posun v úrovni našich znalostí, environmentální prvky hrající roli v patofyziologii tohoto onemocnění se stále nedaří uspokojivě rozpoznat. Jedním z kandidátních vnějších vlivů by mohl být také lepek, který je znám svým prozánětlivým vlivem na imunitní systém.

2. Diabetes 1. typu

2.1. Charakteristika diabetu 1. typu

Diabetes 1. typu je multifaktoriální onemocnění charakterizované absolutním nedostatkem inzulinu v důsledku destrukce β-buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu autoimunitním procesem (Anderson *et al.* 2005). Na vzniku onemocnění se podílejí genetické faktory a vlivy prostředí (DiMeglio *et al.* 2019). Zatímco faktory ovlivňující genetickou predispozici k onemocnění jsou do větší míry známy, identifikace environmentálních faktorů je dosud jednou z největších výzev jak diabetologie, tak i medicíny jako takové. Význam pátrání po patofyziologických mechanismech rozvoje T1D umocňuje i fakt, že incidence T1D v ČR i globálně stoupá (Patterson *et al.* 2019), což přináší zátěž pro nejen pacienty, ale klade nároky i na celý zdravotnický systém. Případný objev environmentálního spouštěče T1D by pak měl v rámci možnosti léčby či prevence významné důsledky medicínské, sociální i ekonomické.

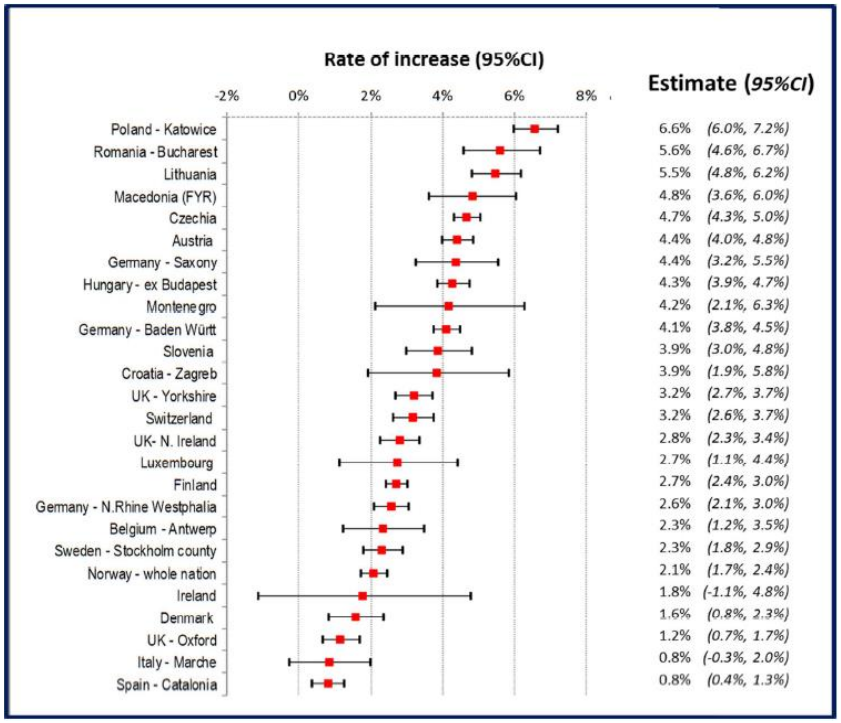
2.2. Epidemiologie diabetu 1. typu

Diabetes 1. typu tvoří celosvětově přibližně 5-10 % všech případů diabetu (American Diabetes Association 2015). Incidence i prevalence T1D globálně stoupá cca o 3-4 % ročně (Patterson *et al.* 2019; Maahs *et al.* 2010), přičemž největší vzestup incidence je pozorován v dětské populaci (Chobot *et al.* 2017). Nárůst incidence T1D je celosvětově příliš velký na to, aby mohl být vysvětlen genetickými faktory, je tedy zřejmé, že příčinou musí být změny prostředí a životního stylu (Knip *et al.* 2011). Nárůst incidence se přitom netýká pouze T1D, ale také celé řady dalších autoimunitních (Farrokhyar *et al.* 2001) a alergických (Upton *et al.* 2000) onemocnění, což ilustruje zásadní vliv environmentálních faktorů na funkci imunitního systému obecně.

Incidence T1D je v různých částech světa rozdílná. Nejvyšší incidence je pozorována ve Finsku a na Sardinii, naopak v Číně a zemích Jižní Ameriky je incidence

T1D nízká (Karvonen *et al.* 2000; Patterson *et al.* 2009). Na rozdíl od mnoha autoimunitních onemocnění, není mezi nově diagnostikovanými pacienty převaha žen (Karvonen *et al.* 2000). Vrchol incidence spadá celosvětově do období mezi 10-14 let věku (Karvonen *et al.* 2000). Současná česká data jsou k dispozici v rámci Českého registru dětí s diabetem a stanovují incidenci T1D u dětí mladších 15 let na 24 případů na 100 000 obyvatel, což je srovnatelná se sousedními zeměmi (Šumník *et al.* 2020). Prevalence v dětské populaci činí přibližně 1:500 zdravých dětí, celkově je v ČR léčeno okolo 4400 dětí mladších 19 let (Šumník *et al.* 2020).

Obrázek č. 1: Průměrná roční změna incidence T1D u dětí mladších 15 let v 26 evropských centrech mezi lety 1989-2013 (Převzato z Patterson *et al.* 2019)



2.3. Příčiny vzniku diabetu 1. typu

2.3.1. Genetické determinanty vzniku diabetu 1. typu

Hlavním nositelem genetického rizika pro T1D u člověka je oblast genů kódujících HLA (Human Leukocyte Antigens) II. třídy. V závislosti na haplotypu se celoživotní riziko

rozvoje diabetu pro nositele výrazně mění. Zatímco haplotyp HLA DRB1*04:05-DQA1*03:01-DQB1*03:02 zvyšuje riziko T1D až jedenáctinásobně a HLA DRB1*04:01-DQA1*03:01-DQB1*03:02 (dříve DR4) osminásobně, jiné haplotypy např. HLA DRB1*14:01-DQA1*01:01-DQB1*05:03 (dříve DR6) riziko až padesátinásobně snižují. (Erlich *et al.* 2008). Kromě HLA genů bylo v rámci celogenomových asociačních studií identifikováno přes 60 genů, jejichž určité alely jsou asociovány s rizikem T1D (Noble 2015). Jedná se zejména o geny, jejichž produkty ovlivňují funkci imunitního systému, což není nijak překvapivé vzhledem k povaze tohoto onemocnění. Příkladem jsou například imunoregulátory CTLA4 a PTPN22, které nosičům rizikových alel zvyšují riziko rozvoje T1D až dvojnásobně (Wang *et al.* 2014; Bottini *et al.* 2014). Riziko je rovněž zvýšeno pro některá další autoimunitní onemocnění například revmatoidní artritidu (Bottini *et al.* 2014).

2.3.2. Environmentální determinanty vzniku diabetu 1. typu

Zásadní příspěvek zevních vlivů při vzniku a patogenezi autoimunitního diabetu je nezpochybnitelný, jak dokazují následující klinická a epidemiologická pozorování: 1) U monozygotních dvojčat je celoživotní riziko pro rozvoj T1D u sourozence pacienta pouze přibližně 50 % (Barnett *et al.* 1981) 2) Existují velké rozdíly v incidenci T1D u geneticky velmi podobných skupin žijících v různých státech a socioekonomických podmínkách (Kondrashova *et al.* 2005) 3) Byl pozorován prudký nárůst incidence u imigrantů přicházejících ze zemí s nízkou incidencí do zemí s vysokou incidencí a naopak (Akerblom *et al.* 1998).

Identifikace konkrétních spouštěcích faktorů T1D je však komplikovaná, a to z několika důvodů: 1) začátek autoimunitního procesu předchází klinickou manifestaci o několik měsíců či let; 2) neexistují dostatečně specifické biomarkery schopné detekovat časnou destrukci β-buněk a její dynamiku; 3) spouštěcí faktory jsou pravděpodobně komplexní a u jednotlivců se liší, což dělá z T1D z imunopatologického hlediska spíše skupinu onemocnění.

Mezi nejčastěji zkoumané kandidátní spouštěcí faktory patří virové infekce (Hyoty 2016), zejména potom skupina enterovirů. Enteroviry byly skutečně nalezeny v tkáni slinivky břišní u pacientů nově manifestovaným T1D (Krogvold *et al.* 2015) a rovněž

jejich prodloužené vylučování ve střevech v průběhu prvních měsíců života je asociováno s rozvojem autoimunity (Endesfelder *et al.* 2019), nicméně velká longitudinální studie u vysoce rizikových dětí asociaci neprokázala (Tapia *et al.* 2011). Stejně tak infekce příbuznými parechoviry nebyla asociována s rozvojem T1D (Tauriainen *et al.* 2007). Dalším z potenciálních akcelerátorů rozvoje T1D je složení bakteriální mikroflóry střeva (Knip *et al.* 2017). Zajímavá byla zejména zjištění týkající se nárůstu četnosti některých druhů z kmene Bacteroidetes v období před manifestací (Davis-Richardson *et al.* 2014), nicméně ani zde velké multicentrické studie původní výsledky nepotvrdily (Vatanen *et al.* 2018). Zejména protektivní roli by mohly hrát také bakterie zasahující do metabolismu mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA) (Vatanen *et al.* 2018). Naopak některé zpočátku slibné kandidátní faktory diabetogenního procesu (délka kojení, podávání hydrolyzátu bílkoviny kravského mléka) se ukázaly jako nezávislé na vzniku a rozvoji T1D (Sorkio *et al.* 2010; Knip *et al.* 2018). Nejednoznačný je v tomto smyslu vliv vitamínu D (Raab *et al.* 2014; Makinen *et al.* 2016) a časování a míry konzumace cereálních proteinů (zejména lepku) (Antvorskov *et al.* 2014) (více viz kapitola 3.3.).

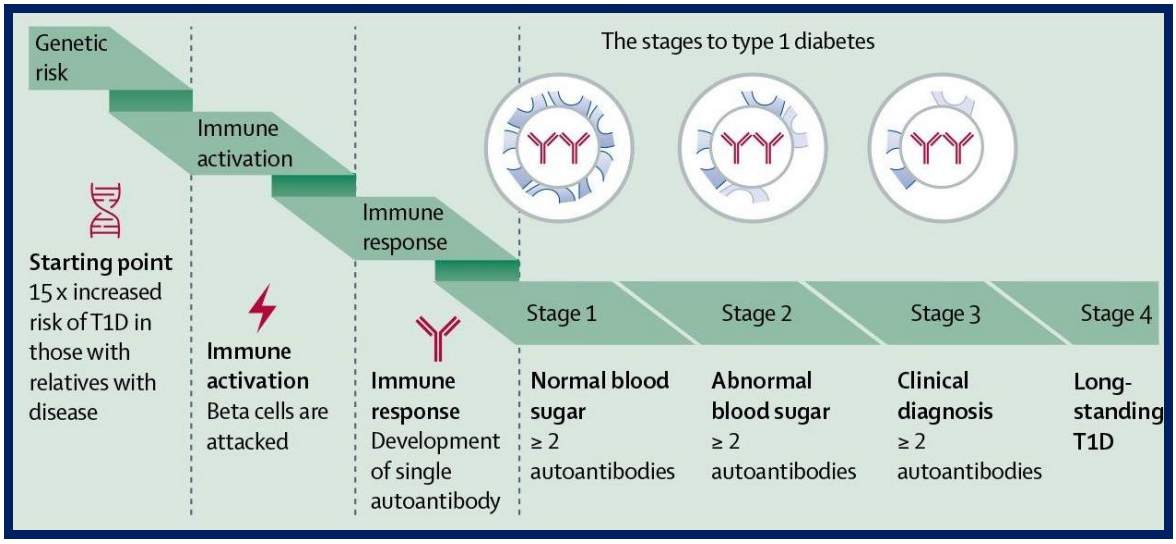
2.4. Patogeneze diabetu 1. typu

Markerem první fáze T1D charakterizované asymptomatickým průběhem a normoglykémií je pozitivita dvou a více autoprotilátek specifických pro beta-buňky Langerhansových ostrůvků (Insel *et al.* 2015). Mezi ně řadíme protilátky proti buňkám ostrůvků (ICA), dekarboxyláze kyseliny glutamové isoformě 65kDA (GADA65), transmembránovému proteinu ostrůvků tyrosin-fosfatáze IA2 (IA2A), proti insulinu (IAA) a proti zinkovému transportéru ZnT8 (ZnT8A). Longitudinální studie cílené na geneticky selektovanou populaci novorozenců prokázaly, že k sérokonverzi dochází obvykle poměrně časně v průběhu života pacienta s vrcholem četnosti ve dvou letech (Knip *et al.* 2010). Zatímco séropozitivita jediné z protilátek nutně k progresi a rozvoji T1D nevede, pozitivita dvou a více protilátek vede v průběhu následujících měsíců nebo let k rozvoji dalších fází T1D (Ziegler *et al.* 2013). Z imunologického hlediska je tato fáze typická kromě pozitivity autoprotilátek též infiltrací Langerhansových ostrůvků slinivky břišní imunitními buňkami (zejména cytotoxickými CD8+ T-lymfocyty a makrofágy) a destrukci β-buněk.

Druhá fáze T1D je kromě pozitivity autoprotilátek definována porušenou glukózovou tolerancí v důsledku postupně probíhající destrukce β-buněk pankreatu, pacienti jsou nicméně stále asymptomatičtí. Onemocnění je možno odhalit pomocí jednoduchých klinických testů jako je například orální glukózový toleranční test.

Ve třetí fázi diabetogenního procesu přichází většina dětí s nově zachyceným T1D. Glykémie již zvýšena trvale a vede k typickým klinickým příznakům (polyurie, polydipsie, úbytek hmotnosti, únava), které pacienta dovedou k lékaři a poté k diagnóze. Z výsledků studií provedených na animálních modelech a na základě klinických kazuistických pozorování předpokládáme, že v době stanovení klinické diagnózy T1D je zachováno přibližně 20-40 % původního množství a kapacity β-buněk (Akirav *et al.* 2008), které jsou i nadále schopny produkovat inzulin. Tento endogenní inzulin se spolu s terapeuticky podávaným inzulinem podílí na regulaci glykémie a přispívá k obvykle lepší metabolické kompenzaci T1D v průběhu obvykle několika měsíců až jednotlivých let následujících po manifestaci onemocnění (Lachin *et al.* 2014). Tvorba endogenního inzulinu, vede k jevu nazývanému částečná klinická remise, kdy je možno redukovat dávky podávaného inzulinu i pod úroveň dávek podávaných při manifestaci. Vzácně je i u některých pacientů možno i podávání inzulinu načas zcela vysadit bez negativního vlivu na kompenzaci (tzv. úplná klinická remise). Rozvoj a délku remise ovlivňuje zejména věk a BMI pacientů a také hodnota pH při diagnóze T1D (Mortensen *et al.* 2010; Ludvigsson *et al.* 2013). Období remise nicméně obvykle trvá pouze několik týdnů či měsíců (Nagl *et al.* 2017). V průběhu času poté dojde u části pacientů k destrukci všech β-buněk pankreatu. Výjimkou ovšem nejsou ani pacienti (přibližně 30-80 %), kteří si zachovávají minimální sekreci inzulinu i mnoho let po diagnóze T1D (Davis *et al.* 2015).

Obrázek č. 2: Patogenetické mechanismy a fáze T1D (Převzato z Greenbaum *et al.* 2018)



2.5. Strategie prevence a terapie diabetu 1. typu

2.5.1. Strategie prevence diabetu 1. typu

Preventivní diabetologie představuje rychle se rozvíjející podobor, který v posledním období zaznamenal výrazné úspěchy u obou nejčastějších typů diabetu. V rámci prevence T1D lze rozlišit tři strategie. **Primární prevence** spočívá v eliminaci spouštěcího faktoru s cílem zabránění vzniku T1D ještě před rozvojem autoimunity. **Sekundární prevence** zahrnuje postupy spočívající v zastavení či zpomalení progrese onemocnění u pacientů s pozitivními ostrůvkovými autoprotilátkami ještě před rozvojem poruchy glukózové tolerance (tedy ve fázi 1). **Terciární prevencí** se pak myslí zabránění či zpomalení ztráty zbytkové kapacity β-buněk u pacientů s klinickou diagnózou T1D (fáze 2 a 3).

K vyhledávání pacientů vhodných pro metody primární či sekundární prevence je zapotřebí velmi nákladných plošných screeningových programů, které identifikují pacienty se zvýšeným genetickým rizikem či pozitivitou autoprotilátek. Takové programy jsou nyní prováděny pouze jako součást klinických studií s jasně danými vstupními kritérii (Krischer *et al.* 2019) či v rámci populačního screeningu prováděného v některých samosprávních celcích (Bavorsko, Dolní Sasko) (Raab *et al.* 2016).

Je zřejmé, že efektivní programy primární prevence jsou bez znalosti spouštěcího faktoru T1D velmi obtížné. Příkladem projektu, který byl zahájen na základě povzbudivých výsledků pilotní studie, může být multicentrická studie TRIGR, na které se aktivně podílela řada center z ČR. Po 11 letech sledování zde nebyl prokázán žádný vliv užití hydrolyzované kojenecké formule oproti jejímu standardnímu složení (Knip *et al.* 2018).

Recentně je preventivní strategie použita ve finské klinické studii s vakcinací proti Coxsackie B enteroviru u vybrané vysoce rizikové populace (Hyoty *et al.* 2018). Sekundární prevence je v současné době cílem řady studií prováděných zejména pomocí imunomodulace. Dosud největší efektivity bylo dosaženo aplikací monoklonální protilátky proti CD3 antigenu CD8+ cytotoxických lymfocytů (teplizumab), která vedla k významnému oddálení diagnózy T1D u velmi rizikové populace prvostupňových příbuzných diabetických pacientů s pozitivitou dvou a více autoprotilátek (Herold *et al.* 2019). Hlavní oblastí, na kterou se nicméně zaměřuje většina terapeuticko-preventivních opatření je ovšem terciární prevence. Zde je výhodou zejména snadný a nenákladný výběr pacientů a existence robustních biochemických a jiných markerů k hodnocení výsledků metody. Jistou nevýhodou tohoto přístupu je však vyčerpaná reziduální kapacita β-buněk v okamžiku klinické manifestace T1D, což snižuje klinickou efektivitu terciární prevence. Výsledky dosud provedených studií tak dosud vždy ukázaly pouze tranzientní vliv na další průběh T1D (Ludvigsson *et al.* 2017; Orban *et al.* 2011).

3. Lepek a diabetes 1. typu

3.1. Složení a biochemické vlastnosti lepku

Pojem lepek představuje společný název pro bílkoviny glutenin a gliadin, které se vyskytují v některých obilninách, například pšenici, ječmeni a žitu. Tyto bílkoviny propůjčují těstu vyráběnému z jejich mouky viskozitu a soudržnost. Svým biochemickým složením se liší od ostatních bílkovin obilovin. Jejich rozdílné složení je činí odolnější vůči enzymatické degradaci ve střevech (Shewry *et al.* 2002), jejich nerozložitelné peptidy jsou biochemicky aktivní a mohou být antigenním stimulem pro střevní imunitu (Piper *et al.* 2004). Proto lepek patří mezi kandidátní nutričních spouštěče a/nebo akcelerátory autoimunitních onemocnění, včetně ostrůvkové autoimunity.

3.2. Animální studie vlivu lepku na T1D

Bezlepková dieta (GFD) vede k významnému snížení incidence T1D u neobézních diabetických (NOD) myší. Longitudinální studie ukázala, že při krmení bezlepkovou dietou dochází ke snížení incidence diabetu z 64 na 15 % (Funda *et al.* 1999). K další redukci incidence autoimunitního diabetu (až na 6 %) dochází, pokud myši nebyly vystaveny lepku ani in utero (Funda *et al.* 2008). Pro dosažení diabetes-protektivního efektu bezlepkové diety u potomků je navíc postačující právě pouze období těhotenství a laktace u jejich matek (Hansen *et al.* 2014). Naopak strava bohatá na pšenici podporuje rozvoj T1D jak u NOD myší (Coleman et al. 1990), tak u BioBreeding potkanů náchylných k diabetu (BB DP) (Scott 1996).

3.3. Humánní studie vlivu lepku na T1D

3.3.1. Lepek před rozvojem autoimunity

Výsledky studií zkoumajících vliv lepku na vznik a rozvoj ostrůvkové autoimunity v období před manifestací T1D jsou sporné. Zatímco rozsáhlá mezinárodní studie dětí s rizikovým HLA genotypem TEDDY (The Environmental Determinants of Diabetes in the Young) ukázala vyšší riziko ostrůvkové autoimunity, pokud je lepek přidán do stravy až po devátém měsíci věku (Uusitalo *et al.* 2018), v německé studii BABYDIET bylo pozorováno zvýšené riziko při zavedení lepku do stravy již před třetím měsícem, naopak pozdější zavedení riziko sérokonverze neovlivňovalo (Ziegler *et al.* 2003). Na základě výsledků mezinárodní studie DAISY bylo pro zavedení lepku do kojenecké stravy stanoveno vhodné období mezi 3 a 7 měsíci. Při introdukci lepku mimo toto období pak bylo riziko rozvoje autoimunity vyšší (Norris *et al.* 2003). Na základě těchto nálezů byla v Německu provedena intervenční studie s oddálením introdukce lepku do stravy u rizikových dětí (po dvanáctém vs. po šestém měsíci), nicméně tato strategie k snížení rizika rozvoje autoimunity ani redukci T1D u rizikových dětí nevedla (Hummel *et al.* 2011; Beyerlein *et al.* 2014). Za zmínku stojí také dánská studie, která ukazuje na vyšší riziko rozvoje diabetu u dětí žen, které během těhotenství přijímaly ve stravě více lepku (Antvorskov et al. 2018). V tomto kontextu je také zajímavý fakt, že i přes známou

asociaci a vyšší riziko céliakie u T1D (Collin *et al.* 2002; Sumnik *et al.* 2005), k rozvoji T1D po diagnóze céliakie dochází výrazně méně často, což bývá interpretováno jako možný protektivní vliv GFD (Cosnes *et al.* 2008).

3.3.2. Lepek a probíhající autoimunita

Výsledky studií, které zkoumaly vliv bezlepkové diety na již rozvinutou autoimunitu s cílem oddálení manifestace T1D (sekundární prevence) nesvědčí pro výrazný pozitivní efekt této strategie. Nasazení bezlepkové diety po dobu 1 roku u sedmi dětí s vícečetnou pozitivitou autoprotilátek oproti 30 dětem se standardní stravou nevedlo k redukci titru autoprotilátek ani oddálení rozvoje T1D (Fuchtenbusch *et al.* 2004), nicméně je zajímavé, že v průběhu dodržování GFD žádné z dětí nedošlo do klinické fáze T1D. Rovněž v italské studii u 17 mladých pacientů s vícečetnou pozitivitou autoprotilátek nedošlo po zahájení bezlepkové diety k redukci titru protilátek. Zajímavým zjištěním ale byla zlepšená odpověď inzulinu na podání intravenózní glukózy, která se následně po ukončení bezlepkové diety opět zhoršila (Pastore *et al.* 2003). Dlouhodobá data zkoumající roli lepku v sekundární prevenci T1D nejsou k dispozici.

3.3.3. Lepek a manifestní T1D

Bezlepková dieta u pacientů s již manifestním onemocněním byla popsána jednak kazuisticky, kdy vedla k výraznému prodloužení období klinické remise bez potřeby inzulinoterapie (Sildorf *et al.* 2012), a rovněž v rámci menší přímo nekontrolované intervenční studie, kdy vedla k prodloužení období částečné klinické remise a zlepšení kompenzace u 15 nově diagnostikovaných pacientů oproti historickým kontrolám (Svensson *et al.* 2016).

Role lepku v rozvoji a průběhu ostrůvkové autoimunity je však i přes intenzivní výzkum této oblasti dosud nejasná. Dle dostupných studií by se ovšem u geneticky predisponovaných jedinců mohlo jednat o jeden z kandidátních spouštěčů či akcelerátorů autoimunity. Ještě méně dat je k dispozici o roli lepku v další progresi onemocnění a jeho vlivu na metabolické parametry u pacientů s T1D.

4. Střevní mikrobiom a diabetes 1. typu

4.1. Střevní mikrobiom člověka

Dospělý lidský organizmus obsahuje ve střevě asi 10^{13}-10^{14} mikroorganizmů. Střevní mikrobiom (tj. genom všech střevních mikroorganizmů) je tak přibližně 150x větší než lidský genom (Qin *et al.* 2010). Buněčné stěny gram-negativních bakterií obsahují lipopolysacharidy (LPS), které indukují obranné imunitní reakce organizmu. Za normálních okolností je tato odpověď tlumena a mezi střevními mikroorganizmy a imunitním systémem je nastolena rovnováha (Takiishi *et al.* 2017). V případě změny složení střevního mikrobiomu (tzv. dysbióze) nicméně může dojít k narušení této rovnováhy a rozvoji prozánětlivého stavu (Sommer *et al.* 2013).

Změny ve způsobu života (např. užívání antibiotik, rozšíření balené vody a postupy úpravy stravy) v průběhu posledních několika dekád vedou k podstatným změnám ve složení lidské komenzální mikroflóry (von Hertzen *et al.* 2015). Tyto změny se týkají zejména střevní mikroflóry (Quercia *et al.* 2013). Vzhledem k její úzké interakci s imunitním systémem zejména v oblasti jeho maturace a navozování imunotolerance (Hooper *et al.* 2012) je zřejmé, že jsou její změny dávány do souvislosti s imunně podmíněnými onemocněními včetně T1D.

4.2. Studie na zvířecích modelech

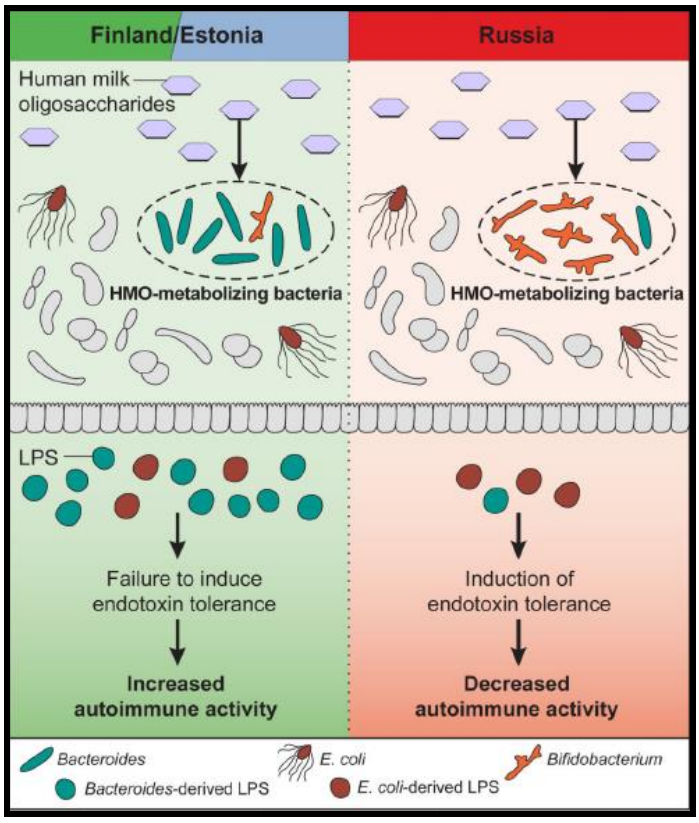
Souvislost mezi složením střevní mikroflóry a T1D je jasně patrná u zvířecích modelů. Pozorování ukazují, že jak bezmikrobní prostředí, tak antibiotická léčba vedou u NOD myší k vyšší incidenci diabetu (Pozzilli *et al.* 1993). Naopak podání i usmrcených mikrobů NOD myším vede k jejímu snížení (Matsuzaki *et al.* 1997), což naznačuje, že komenzální střevní mikroflóra resp. antigenní stimulace průběh onemocnění modifikuje a má protektivní účinky. Střevní mikroflóra navíc u krys modifikuje i střevní propustnost (Garcia-Lafuente *et al.* 2001), která může být jedním z aspektů v patogenezi T1D (viz níže).

4.3. Střevní mikrobiom a T1D

4.3.1. Bakterie asociované s rozvojem diabetu 1. typu

Role střevního mikrobiomu v patogenezi T1D u lidí zůstává nicméně stále nejasná. Dosud se nepodařilo odhalit organismus či skupinu organismů, které by šlo označit za kauzální pro rozvoj T1D (Knip *et al.* 2017). Možná spojitost mezi T1D a střevní mikroflórou mohla být relevantně studována až v nedávných letech s rozvojem metody masové sekvenace bakteriální ribozomální 16S RNA. Za použití této metody byl ve finských studiích pozorován pokles diverzity střevního mikrobiomu u pacientů, u kterých došlo k rozvoji T1D (Kostic *et al.* 2015). Zajímavá byla také zjištění týkající se navýšení relativní četnosti kmene Bacteroidetes, konkrétně druhu *Bacteroides dorei* v období před sérokonverzí ostrůvkových autoprotilátek (Davis-Richardson *et al.* 2014). Rovněž zastoupení kmene Bacteroidetes bylo výrazně vyšší ve finské a estonské populaci (s vysokou incidencí T1D) oproti geneticky velmi podobné populaci z ruské Karélie (s nízkou incidencí T1D) (Vatanen *et al.* 2016), kde dominují Bifidocateria. Popsané změny vedou k rozdílům v metabolizmu sacharidů mateřského mléka a stimulaci imunity povrchovými LPS mezi uvedenými populacemi. Zatímco ve Finsku a Estonsku jsou hlavní LPS ty pocházející z kmene Bacteroidetes a mají inhibiční účinky na tolerogenní imunitní procesy, v Rusku pochází hlavní LPS z *Escherichie coli*, která naopak imunitní toleranci stimuluje (viz obr. 3) (Vatanen *et al.* 2016). Bacteroidetes je nicméně v lidském střevě velmi prevalentní kmen a změny v jeho četnosti tak mohou reflektovat spíše interindividuální variabilitu než patogenicitu. Tato variabilita je zejména mezi dětmi velmi vysoká, což platí i pro zdravou populaci a komplikuje tak hledání odpovědí (Kemppainen *et al.* 2015). Obtíže v interpretaci také činí geografické rozdíly. Tyto problémy se snažila adresovat velká multicentrická prospektivní studie TEDDY, jejíž celkové výsledky ovšem žádné zřejmé asociace mezi složením bakteriálního osídlení střeva a rozvojem T1D nepřinesly (Vatanen *et al.* 2018; Stewart et al. 2018).

Obrázek č. 3 – Schéma předpokládaného mechanismu rozdílů v navozování imunotolerance u finských/estonských a ruských dětí s vysokým rizikem rozvoje T1D. (Převzato z Vatanen *et al.* 2016).



4.3.2. Bakterie asociované s ochranou proti diabetu 1. typu

Ruku v ruce se snahou o nalezení druhů, které přispívají k rozvoji T1D jde také snaha o identifikaci bakterií, které by naopak mohly rozvoj autoimunity zastavit či oddálit. V této souvislosti se zejména hovoří o *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis*, které rozkladem oligosacharidů mateřského mléka vytváří mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), jež mají imunoregulační účinky a jejichž podávání vede k prevenci diabetu v animálních modelech (Insel *et al.* 2018; Marino *et al.* 2017). Tato baktérie se považuje v rozvinutém světě za takzvaného „mizejícího mikroba“, tedy bakterii, jejíž četnost klesá v souvislosti se západním stylem života a vyšším životním standardem (Insel *et al.* 2018). Její četnost v některých studiích inverzně koreluje s incidencí diabetu (Vatanen *et al.* 2016). Dalším potenciálně T1D protektivním kandidátem je bakterie *Akkermansia muciniphila*, jejíž metabolické produkty podporují tvorbu střevního hlenu a zlepšují

bariérovou funkci střeva (Peng *et al.* 2009), což vede ke zlepšení glukózové homeostázy a snížení incidence diabetu u zvířecích modelů (Shin *et al.* 2014; Hanninen *et al.* 2018).

Zatímco určitý podíl střevního mikrobiomu na rozvoj T1D je u zvířecích modelů pravděpodobný, u lidí jsou zatím důkazy velmi nepřímé a neprůkazné. Další zkoumání této oblasti nicméně může nejen obohatit naše poznání T1D, ale také odkrýt možné budoucí terapeutické a preventivní přístupy.

4.3.3. Vliv lepku a GFD na střevní mikrobiom

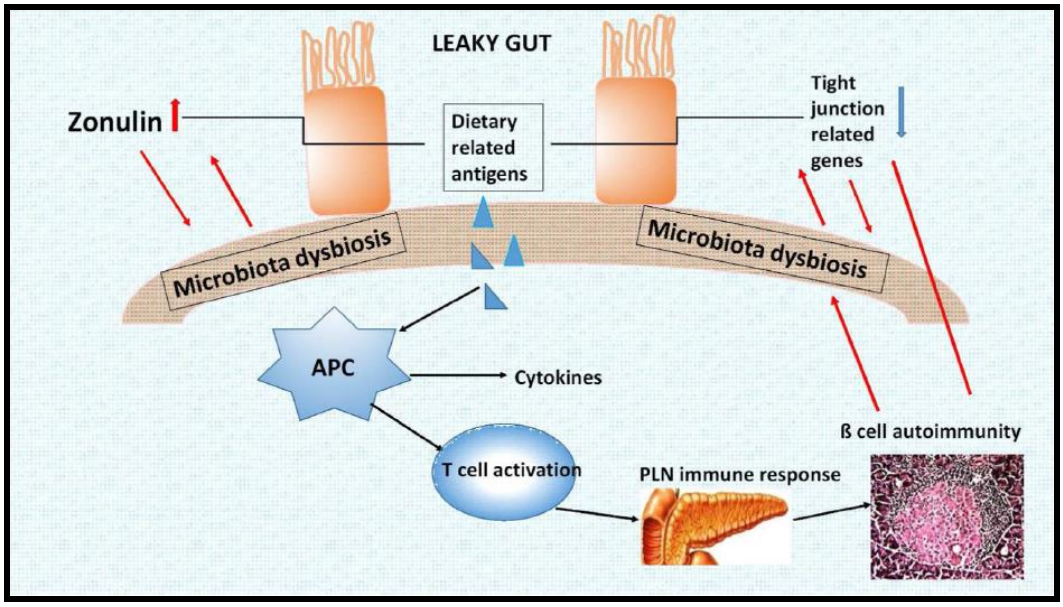
Bezlepková dieta přímo ovlivňuje složení střevního mikrobiomu a to jak u pacientů s céliakií (Nistal *et al.* 2012), tak u zdravých lidí (Bonder *et al.* 2016). Důvodem je pravděpodobně snížení příjmu polysacharidů spojené s přechodem na GFD, přičemž tyto polysacharidy slouží jako energetický zdroj pro některé ze střevních bakterií (David *et al.* 2014). Rovněž u NOD myší byl pozorován úbytek v četnosti bakterií tlustého střeva po zahájení GFD (Hansen *et al.* 2006) a zejména vzestup zastoupení *Akkermansia muciniphila*, která je dávána do souvislosti s redukcí incidence diabetu u těchto myší. Po navrácení glutenu zpět do stravy rozdíly ve složení mikroflóry a také diabetes-protektivní efekt vymizel (Marietta *et al.* 2013). Bezlepková dieta tak má potenciál měnit složení střevní mikroflóry, což může být důležitým spojovacím prvkem mezi lepkem a T1D.

5. Střevní propustnost a diabetes 1. typu

Spojujícím dílkem mezi lepkem přijímaným ve stravě, střevní mikroflórou a imunitní reakcí by mohlo být ovlivnění střevní propustnosti. Zvýšení propustnosti je jedním z časných dějů v patogenezi céliakie (Fasano *et al.* 2000) a je patrné i v případě osob s T1D v období bezprostředně předcházejícím klinické diagnóze (Bosi *et al.* 2006). Pacienti s více než dvěma protilátkami proti strukturám β-buněk, u kterých se T1D klinicky rozvinul, měli vyšší střevní propustnost v porovnání s těmi, u nichž ke klinické diagnóze nedošlo (Harbison *et al.* 2019). To naznačuje, že by u pacientů směřujících k T1D mohlo docházet k snazšímu průchodu antigenů z lumen skrze střevní stěnu a jejich četnějšímu kontaktu s imunitním systémem. Rovněž měření zonulinu, jediného

fyziologického proteinu ovlivňujícího oblast těsných spojení zonula occludens mezi enterocyty střevního epitelu, ukazují, že k poruše intestinální bariéry během trvání diabetu dochází, a to jak u animálních modelů (Watts *et al.* 2005), tak u osob s T1D a do určité míry též u jejich nediabetických příbuzných (Sapone *et al.* 2006). Pokud se podaří funkci intestinální bariéry zlepšit (například podáním hydrolyzovaného kaseinu), dochází u zvířecího modelu k prevenci diabetu (Visser *et al.* 2010). Stejně tak přímá blokáda receptorů pro zonulin snižuje incidenci diabetu BBDP krys o 70 % (Watts *et al.* 2006). Zároveň bylo zjištěno, že lepek přímo ovlivňuje vyplavování zonulinu z buněk a vede ke zvýšení střevní propustnosti (Lammers *et al.* 2008). Rovněž některé druhy bakterií (některé druhy *Escherichia coli* či *Salmonella typhimurium*) jsou schopny stimulovat vyplavování tělu vlastního zonulinu a tím ovlivňovat střevní propustnost (El Asmar *et al.* 2002). Publikované studie tak souhrnem svědčí pro to, že změny ve střevní propustnosti a jejich ovlivnění střevními bakteriemi a lepkem mohou hrát roli v patogenezi T1D.

Obrázek č. 4 – Schéma předpokládaného mechanismu zvýšené střevní propustnosti v patogenezi T1D. (Převzato z Li *et al.* 2015)



6. Imunita a diabetes 1. typu

6.1. Role imunitních buněk v patogenezi T1D

Destrukce β-buněk pankreatu je u T1D podmíněna autoimunitní reakcí, na níž se podílejí CD4+ i CD8+ T-lymfocyty (Todd *et al.* 2011). Studie provedené na zvířecích modelech prokazují, že aktivace obou uvedených skupin lymfocytů je nutná a také dostačující pro rozvoj T1D. Přetrvávající pozitivita autoreaktivních paměťových CD4+ i CD8+ T-lymfocytů v krvi je jedním z typických znaků T1D (Burrack *et al.* 2017). Aktivované CD4+ a CD8+ T-lymfocyty byly nalezeny v pankreas drénujících lymfatických uzlinách, jež jsou místem indukce imunitní reakce proti β-buňkám (Graham *et al.* 2011). V souvislosti s manifestací T1D u dětí byl také pozorován pokles CD4+ naivních buněk a naopak vzestup CD4+ centrálních a efektorových paměťových (CD4+CD45RO+) T-lymfocytů (Ren *et al.* 2017).

Studie u lidí i na myších modelech poukazují také na podíl Th1 imunitní odpovědi v diabetogenním procesu (Bach *et al.* 1994) a rovněž na prozánětlivý vliv Th17 buněk zejména ve vztahu k environmentálním faktorům a střevnímu mikrobiomu (Li *et al.* 2015).

Role NK buněk a vrozených imunitních mechanismů je v patogenezi T1D méně zřejmá. Jejich účast při vzniku a rozvoji ostrůvkové autoimunity byla zdokumentována zejména v iniciálních stádiích destrukce β-buněk (Gur *et al.* 2010), nicméně existují i studie poukazující na jejich protektivní funkci (Beilke *et al.* 2012).

Patogeneze T1D pravděpodobně nesouvisí pouze s efektorovými buňkami, ale také s poruchou funkce regulačních mechanismů, respektive s nerovnováhou mezi těmito systémy (Sakaguchi *et al.* 2020). Roli v patogenezi má pravděpodobně absence / dysregulace více podtypů regulačních buněk, nicméně nejvíce jsou v lidských i animálních studiích zmiňovány a studovány Foxp3 T-regulační lymfocyty (Aghili *et al.* 2015, You *et al.* 2008). Jejich pravděpodobně protektivní funkce je mediována jednak přímými buněčnými kontakty, jednak produkcí cytokinů jako IL-10 nebo TGF-β (Bluestone & Tang *et al.* 2005). U NOD myší je jejich ochranná role poměrně spolehlivě prokázána pomocí deplečních experimentů (Ellis *et al.* 2013), ale u lidí se v různých studiích jejich množství

v periferní krvi či produkce cytokinů neshodují (El Essawy *et al.* 2015; Ghonaim *et al.* 2017; Parackova *et al.* 2017). Zajímavý je také fakt, že vyšší množství Foxp3 T-regulačních buněk bylo zjištěno u pacientů se dlouhodobě zachovanou residuální produkcí inzulinu (Haseda *et al.* 2013). Určitou naději také nabízí použití Foxp3 buněk spolu s vybranými efektorovými buňkami coby buněčného markeru odpovědi na imunoterapii (Odegard *et al.* 2015).

K dalším regulačním buňkám souvisejícím s T1D patří také Tr1 T-regulační buňky, což jsou Foxp3- a CD49b+LAG3+ CD4 T-lymfocyty produkující velká množství IL-10 a TGF- β (Chen *et al.* 2003). U NOD myšího modelu došlo přenosem těchto buněk k prevenci diabetu (Mbongue *et al.* 2019) zatímco u lidí je zatím k dispozici pouze malé množství studií. Zajímavý je v tomto pohledu také fakt, že nižší množství Tr1 buněk bylo pozorováno u pacientů s rychlou progresí T1D (Chujo *et al.* 2020).

6.2. Lepek a imunitní systém

Lepek souvisí s imunitou nejen v kontextu céliakie. Přímý efekt lepku na imunitní funkce byl pozorován v řadě in vitro a in vivo studií. Lepek vykazuje vlastnosti podobné lektinům (Köttgen *et al.* 1983) a gliadin, jeho hlavní imunogenní komponenta, přímo stimuluje mechanismy přirozené imunity signalizací a aktivací NF-kappaB (Jelínková *et al.* 2004; Palová-Jelínková *et al.* 2013). Z in vitro studií vyplývá, že oligomery lepku jsou asociovány s vyplavováním prozánětlivých cytokinů u makrofágů (Dall *et al.* 2013) a stimulují maturaci a produkci cytokinů u lidských dendritických buněk (Palova-Jelinkova *et al.* 2005). U NOD myší a BB DP potkanů je na cereálie bohatá strava spojená s indukcí převažujícího prozánětlivého Th1-asociovaného cytokinového vzoru, a to i před rozvojem diabetu (Hoorfar *et al.* 1993; Flohe *et al.* 2003; Chakir *et al.* 2005). Přítomnost s autoimunitou asociovaných Th17 buněk byla rovněž popsána ve zvýšené míře v pankreatických lymfatických uzlinách u myší krmených stravou obsahující lepek. V těchto uzlinách byl také pozorován zánětlivý cytokinový vzor Foxp3– a Foxp3+ T-buněk (Antvorskov *et al.* 2012). Naopak bezlepková strava vedla u těchto myší k indukci protizánětlivého vzoru (Antvorskov *et al.* 2013). Vlivem lepku dochází také k aktivaci vrozené imunity, která souvisí s navozováním imunotolerance k antigenům přijatým stravou (Larsen *et al.* 2015). Vyjma toho působí fragmenty lepku také přímo na

pankreatické β-buňky, kde působením na aktivitu ATP-senzitivních K^+ kanálů ovlivňují dlouhodobou (24 h) avšak nikoliv krátkodobou (30 min) sekreci inzulinu. To má vliv i in vivo na vyšší hmotnost NOD myší dosaženou po aplikaci fragmentů lepku (Dall *et al.* 2013). Rovněž u NOD-DQ8 myší, které jinak diabetes nerozvinou, byla senzitizace pomocí štěpů gliadinu spojená s deplecí Foxp3 T-regulačních lymfocytů a vedla k indukci inzulitidy (Galipeau *et al.* 2011). To je překvapivý odkaz k možné etiologické roli gliadinu, tím spíše, že u T1D dosud neznáme primární autoantigen indukující rozvoj autoimunity (Rose *et al.* 1993). Uvedené studie tak jednoznačně svědčí pro vliv lepku na imunitní funkce prostřednictvím mnohotných imunopatologických cest. Některé z nich se podílí na ostrůvkové autoimunitě.

7. Hypotéza a cíle postgraduálního studia

7.1. Hypotéza

Zavedení GFD po dobu 1 roku u dětí s nově diagnostikovaným T1D bez céliakie vede k zpomalení rychlosti ztráty zbytkové kapacity β-buněk pankreatu, zlepšuje metabolickou kompenzaci pacientů, signifikantně mění jejich střevní mikrobiom, střevní propustnost a odpověď imunitního systému.

7.2. Cíle vědecké práce

1) Posoudit vliv GFD na zbytkovou kapacitu β-buněk u dětí s nově diagnostikovaným T1D bez céliakie.
2) Zjistit, zda má GFD u těchto dětí vliv na metabolickou kompenzaci, délku parciální remise a dávku inzulinu.
3) Analyzovat složení střevního mikrobiomu u této skupiny pacientů a popsat vliv GFD na jeho složení.
4) Posoudit střevní propustnost pacientů na GFD, srovnat ji se stavem před zahájením bezlepkové diety a s kontrolní skupinou diabetických dětí konzumujících lepek.
5) Analyzovat vliv GFD na podtypy T-lymfocytů u dětí s nově diagnostikovaným diabetem 1. typu bez céliakie.
6) Zhodnotit, zda může přenos lidského střevního mikrobiomu snížit incidenci diabetu 1. typu u bezmikrobních (GF) NOD myší, a to v závislosti na rychlosti progrese ztráty funkce β-buněk dárce a popsat změny převzatého střevního mikrobiomu.

8. Metodika

8.1. Pacienti a design studie

Během období náboru do studie mezi lednem 2016 a lednem 2018 byla diagnóza T1D stanovena u 174 dětí na Pediatrické klinice Fakultní nemocnice v Motole a Klinice dětského a dorostového lékařství Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Z těchto dětí 126 splňovalo vstupní kritéria a byla jim nabídnuta účast ve studii.

Vstupní kritéria:

- T1D diagnostikovaný podle kritérií American Diabetes Assocciation (ADA 2015)
- Věk mezi 4 a 17,99 lety při diagnóze T1D
- Pozitivita alespoň jedné ze tří protilátek asociovaných s T1D (IAA, IA2A, GADA65)
- Přítomnost jednoho nebo obou pro T1D rizikových haplotypů (HLA-DQB1*03:02-DQA1*03, DQB1*02-DQA1*05)
- Absence céliakie, negativita protilátek proti tkáňové transglutamináze typu 2 (anti-tTG2) a endomysiu (EMA)
- BMI <2 SD pro daný věk a pohlaví
- Žádné další onemocnění potenciálně ovlivňující imunitní systém nebo citlivost na lepek

Do studie vstoupilo celkem 45 dětí s T1D (tj. 35,7 % oslovených). Děti zahrnuté do studie se ve vstupních parametrech významně nelišily od těch, které nesouhlasily s účastí ve studii (81 pacientů). Porovnání těchto skupin bylo provedeno na základě dat z Českého registru diabetických dětí (Šumník *et al.* 2020) (**Tabulka 1**). Žádné z dětí, které vstoupily do studie, nemělo předchozí zkušenost s bezlepkovou dietou. Zařazení do studijní skupiny bylo ponecháno na rozhodnutí rodičů. Děti v intervenční skupině (26) zahájily výlučnou bezlepkovou dietu ihned po provedení prvního testu smíšenou stravou (MMTT) 38 dní (medián, IQR 31–43) po diagnóze T1D. Kontrolní skupina (19 pacientů) dodržovala po celou dobu studie běžnou diabetickou dietu obsahující lepek.

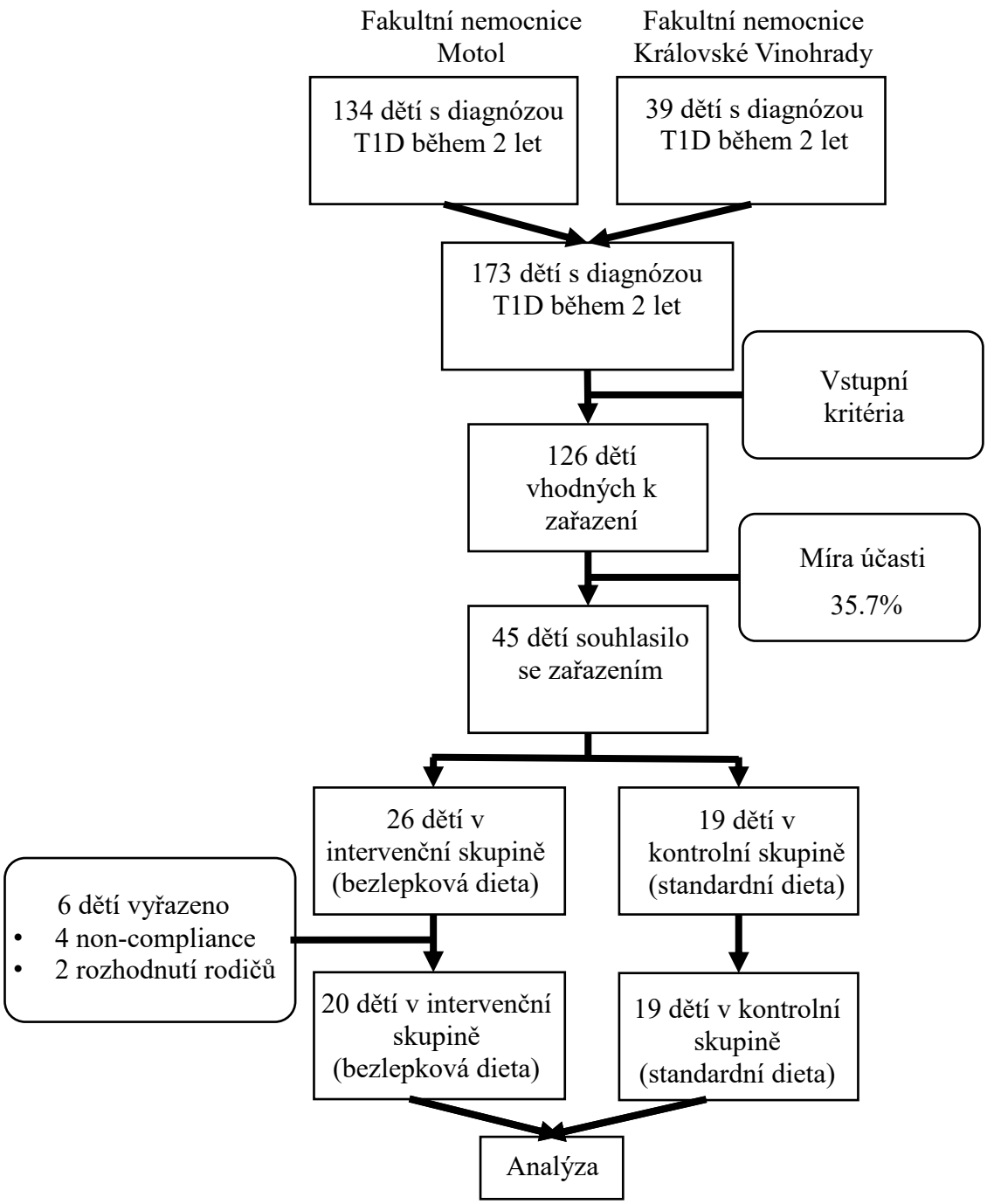
Tabulka 1 Porovnání zařazených a nezařazených dětí do studie

	Zařazení ***n=45***	**Nezařazení** ***n=81***	
	Průměr (SD)	**Průměr (SD)**	***P***
Věk (roky)	10,1 (3,8)	10,2 (3,3)	0,90
pH*	7,4 (0,0)	7,4 (0,1)	0,86
Hmotnost (SD)	0,24 (0,96)	0,44 (1,52)	0,41
BMI (SD)	-0,10 (0,99)	0,22 (1,59)	0,22
HbA1c (mmol/mol)	95,8 (23,2)	88,9 (30,4)	0,18
HbA1c (%)	10,9 (4,3)	10,3 (4,9)	

Data jsou uváděna jako průměr (SD), pH je uvedeno jako medián (IQR). V žádné ze sledovaných veličin nebyl pozorován statisticky významný rozdíl.

Rodiče dvou dětí z intervenční skupiny se rozhodli ukončit studii po šesti měsících od začátku studie. U čtyř pacientů bylo zpětně zjištěno porušování bezlepkové diety a byli proto vyřazeni ze všech analýz. Všechny uváděné výsledky vycházejí z dat zbývajících 20 pacientů v intervenční a 19 pacientů v kontrolní skupině (s občasnými jednotlivými chybějícími výsledky). Distribuci pacientů v rámci studie zobrazuje **Obrázek 4**.

Obrázek 4 Distribuce pacientů v rámci studie



Tabulka 2 znázorňuje vstupní charakteristiky pacientů ve studii. Skupiny se vstupně signifikantně lišily pouze ve směrodatné odchylce BMI (nižší u intervenční skupiny) a pohlaví (převaha chlapců v kontrolní skupině). Všichni pacienti byli při vstupu do studie i v jejím průběhu léčeni intenzifikovaným inzulinovým režimem pomocí inzulinových per.

Tabulka 2 Vstupní charakteristiky pacientů ve studii

	Bezlepková dieta ***n=20***	**Standardní dieta** ***n=19***	
	N (%)	**N (%)**	***P***
Pohlaví *Muž*	10 (50 %)	16 (84,2 %)	0,04*
Žena	10 (50 %)	3 (15,8 %)	
	Průměr (SD)	**Průměr (SD)**	***P***
Věk (roky)	10,7 (3,2)	10,1 (3,5)	0,59
Hmotnost (kg)	38,9 (13,5)	42,6 (19,5)	0,49
Hmotnost (SD)	0,08 (0,76)	0,76 (0,95)	0,02*
BMI (SD)	-0,17 (0,70)	0,54 (1,04)	0,02*
Dny od diagnózy k 1, MMTT	36,5 (10,4)	40,7 (8,4)	0,18
HbA1c (mmol/mol)	65,6 (18,4)	66,3 (12,1)	0,89
HbA1c (%)	8,2 (1,7)	8,2 (1,1)	0,14
Dávka inzulinu (j/kg/den)	0,43 (0,21)	0,57 (0,34)	
Na inzulinovou dávku adjustovaný hemoglobin A1c	9,88 (2,08)	10,50 (2,09)	0,36
AUC C-peptidu (pmol/l)	2030 (1046)	2105 (1117)	0,83
Lačný C-peptid (pmol/l)	303 (142)	372 (255)	0,31
Maximální C-peptid (pmol/l)	1072 (620)	1044 (553)	0,88
pH při diagnóze T1D	7,36 (0,10)	7,32 (0,15)	0,44

Charakteristiky pacientů, kteří dokončili celý rozsah trvání studie při vstupu do studie, data jsou zobrazena jako průměr (SD). Statisticky významný rozdíl je znázorněn hvězdičkou *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001

AUC – plocha pod křivkou, MMTT – test smíšenou stravou, T1D – diabetes 1. typu

8.2. Průběh studie a sledované parametry

8.2.1. Protokol studie a studijní návštěvy

Protokol studie se skládal ze screeningové návštěvy, zařazení pacientů do studijní skupiny a následných návštěv nazvaných M1, M3, M6, M9, M12 a M15 (**Tabulka 3**). Návštěvy korespondovaly s pravidelnými kontrolami v diabetologické ambulanci. Kontroly se uskutečnily vždy s odstupem 3 měsíců, celková délka studie tam byla 15 měsíců. V průběhu screeningu byla hodnocena způsobilost pacienta k zařazení do studie a rodiče/zákonní zástupci byli seznámeni s cíli a průběhem studie a podepsali informovaný souhlas se zařazením do studie. Rovněž byla zaznamenána vstupní klinická a terapeutická data. Během následující návštěvy byli pacienti na přání rodičů zařazeni do jedné ze studijních skupin.

Tabulka 3 Protokol studie

Čas od diagnózy T1D	**0 dní**	**14 dní**	**1 měsíc**	**3 měsíce**	**6 měsíců**	**9 měsíců**	**12 měsíců**	**15 měsíců**
Vstupní screening	X							
Zařazení do skupiny		X						
GFD začátek/konec v intervenční skupině*			X				X	
Test smíšenou stravou (MMTT)			X		X		X	
Hmotnost a tělesná výška	X		X	X	X	X	X	X

HbA1c	X		X	X	X	X	X	X
Dávka inzulinu			X	X	X	X	X	X
IDAA1c			X	X	X	X	X	X
Jídelníčky[†]				X	X	X	X	
Stolice na analýzu GIP			X	X	X	X	X	
Začátek CGM[‡]							X	
Stolice na analýzu mikrobiomu		X	X	X	X	X	X	X
Sérová koncentrace zonulinu			X		X		X	
Poměr laktulózy a mannitolu v moči[§]							X	
Odběr stolice na přenos do GF NOD myší							X	

* Jídelníčky byly vyplňovány za tři dny předcházející návštěvě

† CGM bylo zahájeno v den třetího MMTT a vráceno po sedmi dnech

‡ Ukončení GFD bylo dobrovolné

§ Po jednom dni vyvarování se mléčných produktů

CGM – kontinuální monitoring glykémií, GIP – imunogenní peptidy lepku, GFD – bezlepková dieta, GF NOD – bezmikrobní neobézní diabetické (myši), IDAA1c – na inzulinovou dávku adjustovaný hemoglobin A1c, MMTT – test smíšenou stravou, T1D – diabetes 1. typu

8.2.2. Hodnocení zbytkové kapacity β-buněk a kompenzace T1D

V průběhu návštěv M1, M6 a M12 byl pacientům proveden MMTT dle standardní metodiky (Greenbaum *et al.* 2008) k posouzení plochy pod křivkou (AUC) C-peptidu, jež slouží jako marker zbytkové kapacity β-buněk. Při každé návštěvě (M1-M15) byla pacientovi změřena váha a výška, byla zaznamenána jeho dávka inzulinu na den a odebrán vzorek kapilární krve na vyšetření glykovaného hemoglobinu (HbA1c). Z předchozích dvou údajů byl vypočítán na inzulinovou dávku adjustovaný hemoglobin A1c (IDAA1c), který se používá jako marker částečné remise onemocnění (Mortensen *et al.* 2009). K dalšímu posouzení kompenzace T1D byl pacientům v průběhu M12 nasazen zaslepený kontinuální monitor glykémie (CGM), který byl vrácen po sedmi dnech nepřetržitého používání. Dle recentních doporučení (Battelino *et al.* 2019) byly ve skupinách porovnávány následující parametry - průměrná glykémie (AG), glykemická variabilita (hodnocena jako směrodatná odchylka (SD) všech měření glykémie a jako variační koeficient CV počítaný jako SD/AG x 100), čas v cílovém rozmezí (3.9 – 10.0 mmol/l), čas v hypoglykémii (<3.9 mmol/l) a čas v hyperglykémii (>10 mmol/l).

8.2.3. Hodnocení kvality života pacientů ve studii

Kvalita života (QoL) pacientů a jejich rodičů/zákonných zástupců byla hodnocena při ukončení intervence (M12) pomocí standardizovaného dotazníku PedsQL 3.2 Modul pro diabetes (Varni *et al.* 2018) v oficiální české verzi. Modul se skládá z 32 nebo 33 otázek (dle věkové skupiny) rozdělených do pěti podskupin: symptomy diabetu, překážky v léčbě, dodržování léčby, obavy a komunikace. Pacienti i jejich rodiče/zákonní zástupci vyplňovali dotazníky ve stejnou chvíli nezávisle na sobě. Pacienti pod osm let věku (n=8) samostatný dotazník nevyplňovali.

8.2.4. Kontrola dodržování bezlepkové diety a rozbor jídelníčků

Během kontrol M6 a M12 odevzdávali pacienti jídelníčky za předchozí tři dny. Množství mikro- a makronutrientů a energie pak bylo vyhodnoceno pomocí programu NutriServis PROFI (Forsapi s.r.o., Praha, ČR). Vzorky stolice, které pacienti přinášeli na

každou návštěvu, byly zároveň použity k posouzení obsahu imunogenních peptidů lepku (GIP) pomocí iVylisa GIP-S kitu (Biomedal, Sevilla, Španělsko). Tato metoda má reportovanou diagnostickou senzitivitu 98.5 % a specificitu 100 % (Comino *et al.* 2016). Všichni pacienti, kteří studii dokončili měli na přítomnost GIP testovány alespoň tři vzorky. Testování bylo prováděno retrospektivně a pozitivita GIP v jakémkoliv vzorku během období dodržování GFD byla důvodem k vyřazení pacienta z analýzy.

8.2.5. Sběr vzorků stolice a analýza složení střevního mikrobiomu

Během každé návštěvy (M1-M15) dodali pacienti vzorek stolice získaný odběrem předpřipravenou odběrovou sadou v domácím prostředí. Ihned po odběru byl vzorek zmražen, po transportu do laboratoře byly poté vzorky umístěny v -80°C do doby dalšího zpracování. Bakteriální DNA byla následně izolována pomocí PowerSoil izolačního kitu (Qiagen, Hilden, Německo). Mikrobiální složení bylo následně získáno pomocí sekvenování nové generace hypervariabilních V4 úseků bakteriální 16S rRNA a dále zpracováno pomocí zavedených bioinformatických postupů včetně následné analýzy (Cinek *et al.* 2017).

Celkově bylo analyzováno 135 vzorků stolice pacientů v intervenční skupině a 112 vzorků pacientů v kontrolní skupině. 26 vzorků od pacientů v intervenční skupině bylo získáno před zahájením GFD, rovněž 26 vzorků bylo získáno od pacientů z kontrolní skupiny před návštěvou M1. V průběhu trvání intervence (M1-M12) bylo analyzováno 79 vzorků z intervenční a 63 z kontrolní skupiny. Dalších 28 vzorků bylo analyzováno po ukončení intervence a 23 po návštěvě M12 v kontrolní skupině.

8.2.6. Vyšetřování střevní propustnosti

K posouzení střevní propustnosti byl pacientům při návštěvě M12 měřen poměr vylučování laktulózy a mannitolu do moči (Sequeira et al. 2014). Vyšší poměr je způsoben zvýšeným paracelulárním vstřebáváním laktulózy a je známkou zvýšené střevní

propustnosti. Měření proběhlo z šestihodinového sběru moči po vypití předpřipraveného roztoku laktulózy a mannitolu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

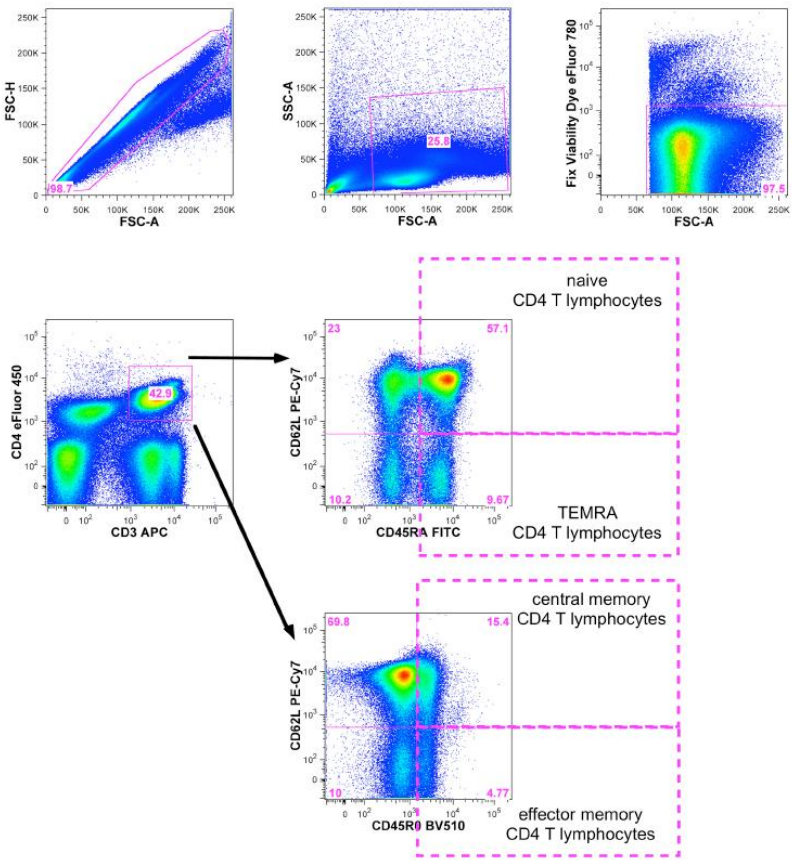
K posouzení longitudinálního vývoje střevní propustnosti byla pacientům při návštěvách M1, M6 a M12 měřena sérová koncentrace zonulinu. Zonulin je sérový protein, který indukuje rozpad těsných spojů mezi enterocyty a jeho vyšší sérová hladina je tak markerem zvýšené střevní propustnosti (Fasano *et al.* 2000). Analýza byla prováděna pomocí Human Zonulin ELISA kit (PromoCell GmbH, Heidelberg, Německo).

8.2.7. Analýza subpopulací T-lymfocytů

K posouzení rozdílů ve vybraných typech lymfocytů a jejich funkční kapacitě byly pacientům odebrány vzorky periferní krve během jejich návštěv v 1., 6. a 12. měsíci. Z krve byly izolovány mononukleární buňky (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) a zmraženy na -150 °C. Před analýzou byly vzorky rozmraženy ve vodní lázni na 37 °C a přeneseny do 10 ml předehřátého média. Po centrifugaci bylo 20 µl vzorku použito k zjištění množství živých buněk. Následně byly vzorky značeny myšími protilátkami proti povrchovým markerům po dobu 25 minut s vyloučením mrtvých buněk. Vzorky jsme pak fixovali/permeabilizovali pomocí Cytofix/Cytoperm kitu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) a dále značeny myšími protilátkami proti nitrobuněčným markerům. K analýze buněčných dat jsme použili průtokového cytometru LSR II (BD Bioscience, San Diego, Kalifornie, USA) a získaná data byla vyhodnocována pomocí softwaru FlowJo (Tree Star, Ashland, Oregon, USA).

Z populací lymfocytů byly předně zkoumány proporce naivních, centrálních paměťových, efektorových paměťových a terminálně diferencovaných efektorových paměťových (TEMRA) CD4+ T-lymfocytů. Naivní CD4+ T-lymfocyty byly charakterizovány povrchovými markery jako CD3+CD4+CD45RA+CD45R0-CD62L+, centrální paměťové jako CD3+CD4+CD45RA-CD45R0+CD62L+, efektorové paměťové jako CD3+CD4+CD45RA-CD45R0+CD62L- a efektorové TEMRA CD4+ T-lymfocyty s re-expresí CD45RA+ jako CD3+CD4+CD45RA+CD45R0-CD62L-. Strategie gatingu je zobrazena na **obrázku 5**.

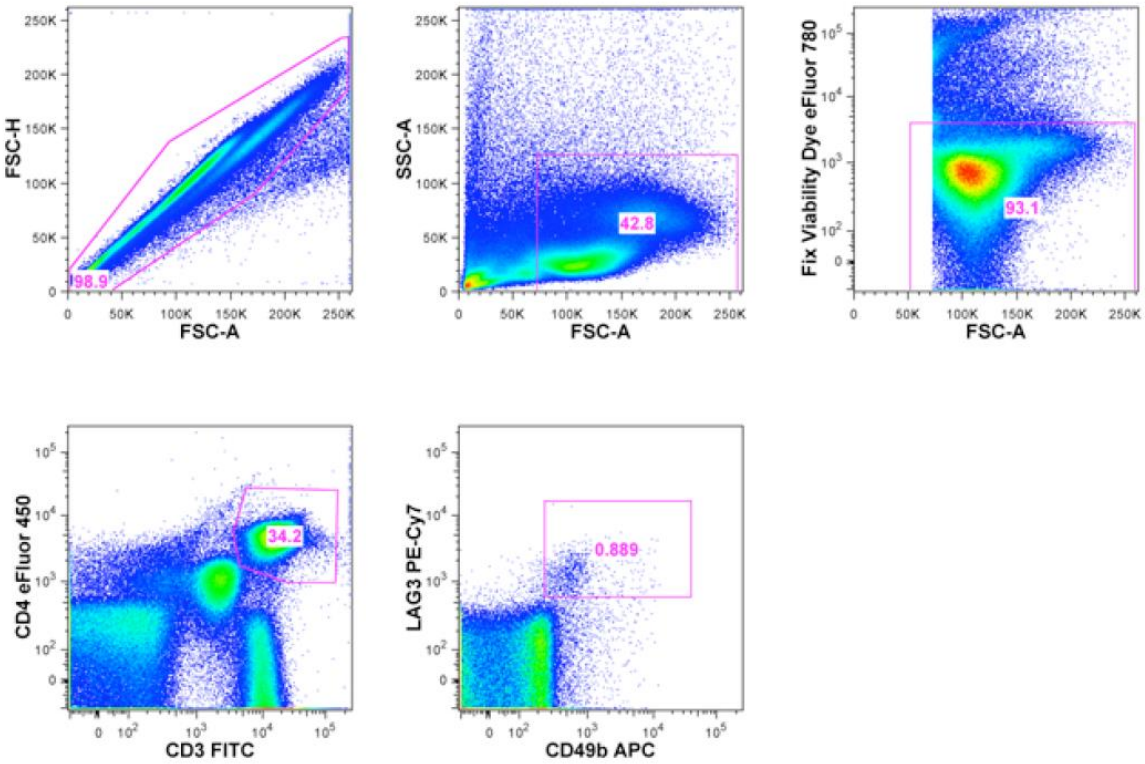
Obrázek 5 – Strategie gatingu pro T-efektorové buňky (CD45R0-CD62L+ T-lymfocyty)



Po diskriminaci dubletů byly definovány lymfocyty a monocyty pomocí FSC-A a SSC-A parametrů. Mrtvé buňky byly vyloučeny na základě barvení Fix Viability Dye eFluor 780 před fixací a permeabilizací pro intracelulární barvení. Naivní CD4+ T-lymfocyty byly stanoveny jako subpopulace CD3+CD4+ buněk/události, které jsou zároveň CD45RA+CD45R0-CD62L+, centrální paměťové CD4+ T-lymfocyty jako procento CD3+CD4+ buněk/události, které jsou zároveň CD45RA-CD45R0+CD62L+, efektorové paměťové CD4+ T-lymfocyty jako procento CD3+CD4+ buněk/události, které jsou zároveň CD45RA-CD45R0+CD62L-, a efektorové CD4+ T-lymfocyty TEMRA s re-expresí CD45RA+ jako procento CD3+CD4+ buněk/události, které jsou zároveň CD45RA+CD45R0-CD62L-.

Další studovanou populací byly Tr1 lymfocyty. Byly charakterizovány jako CD4+CD49b+LAG3+ T-lymfocyty (strategie gatingu je zobrazena na **obrázku 6**). Po fixaci a permeabilizaci byly tyto buňky také značeny na intracelulárně nahromaděný interleukin 10 (IL-10). Z důvodu výrazné aktivity Tr1 lmyfocytů, která způsobuje rychlé odúmrtí buněk i bez polyklonální stimulace nebyly buňky během této analýzy re-stimulovány a produkce IL-10 je pouze nativní.

Obrázek 6 – Strategie gatingu pro Tr1 buňky (CD4+CD49b+LAG3+ T-lymfocyty)



Po diskriminaci dubletů byly definovány lymfocyty a monocyty pomocí FSC-A a SSC-A parametrů. Mrtvé buňky byly vyloučeny na základě barvení Fix Viability Dye eFluor 780 před fixací a permeabilizací pro intracelulární barvení. Tr1 buňky byly stanoveny jako procento CD3+CD4+ událostí, které zároveň exprimují CD49b+LAG3+.

8.2.8. Přenos lidského střevního mikrobiomu do GF NOD myší

Pět z pacientů z původní kohorty bylo vybráno jako dárci stolice k transplantaci střevního mikrobiomu do bezmikrobních NOD myší. Výběr byl proveden na základě rychlosti ztráty zbytkové kapacity β-buněk v MMTT v průběhu 1 roku. Dva z pacientů patřili k tercilu pacientů, kteří ztratili zbytkovou kapacitu β buněk rychle (>75 % ztráty funkce) (Rychlý 1 a 2), zbylí tři k tercilu, jež ztrácel kapacitu pomalu (<28 % ztráty funkce) (Pomalý 1, 2 a 3). Tři z pacientů dodržovali v průběhu roku přísnou GFD, zatímco dva se stravovali běžnou dietou diabetických dětí obsahující lepek. Charakteristika pacientů je uvedena v **tabulce 4**.

Tabulka 4 – Charakteristika dárců stolice k přenosu do bezmikrobních NOD myší

Charakteristika	**Dárce stolice**				
	Rychlý 1	**Rychlý 2**	**Pomalý 1**	**Pomalý 2**	**Pomalý 3**
Demografické parametry					
Pohlaví	Ž	M	M	Ž	M
Věk (roky)	7	14	13	10	13
Hmotnost (kg)	27	81	48	32	56
Data při diagnóze T1D					
HbA1c (mmol/mol)	87	123	87	111	99
HbA1c (%)	10,1	13,4	10,1	12,3	11,2
pH	7,27	7,43	N/A	7,31	7,41
HLA-DQB1, DQA1 genotyp	*DQB1*02/ 03:02, DQA1*03/ 05*	*DQB1*02/ 03:02, DQA1*02/ 03*	*DQB1*02/ 02, DQA1*05/ 05*	*DQB1*03 :01 / 06:01, DQA1*01/ 03*	*DQB1*02/ 03:02, DQA1*03/ 05*
Autoprotilátky	GADA65 IA2A ZnT8A	GADA65 IAA IA2A ZnT8A	GADA65 IA2A ZnT8A	GADA65 IA2A	GADA65 ZnT8A
Dietní intervence	GFD	SD	GFD	GFD	SD
Vstupní data					
AUC C-peptidu při MMTT v 1, měsíci (pmol/l × min)	1270	2227	2334	2350	2233
HbA1c v 1 měsíci (mmol/mol)	65	75	62	56	68

HbA1c v 1 měsíci (%)	8,1	9,0	7,8	7,3	8,4
Denní dávka inzulinu (j/kg)	0,29	1,2	0,38	0,25	0,4
Progrese T1D					
AUC C-peptidu při MMTT v 12, měsíci (pmol/l × min)	300	89	1840	1693	2028
AUC C-peptidu – ztráta od počátku (%)	76,4	96,0	21,2	28,0	9,2
HbA1c ve 12 měsících (mmol/mol)	75	70	48	44	49
HbA1c ve 12 měsících (%)	9,0	8,6	6,5	6,2	6,6
Denní dávka inzulinu ve 12 měsících (j/kg)	0,60	1,36	0,52	0,25	0,44

AUC – plocha pod křivkou, GADA65 – protilátky proti dekarboxyláze kyseliny glutamové, GFD – bezlepková dieta, IAA – protilátky proti inzulinu, IA2A – protilátky proti tyrosin-fosfatáze IA2, M – muž, MMTT – test smíšenou stravou, SD – standardní dieta, T1D – diabetes 1. typu, ZnT8A – protilátky proti zinkovému transportéru, Ž – žena

Při návštěvě v M12 darovali pacienti vzorek čerstvé stolice, jež byl do 2 hodin zpracován v laboratoři postupem používaným při fekální transplantaci (Hamilton *et al.* 2012). Následně byly vzorky zality pufrovaným glycerolem a uskladněny v -80°C do přenosu do GF NOD myší. Složení mikrobiomu bylo analyzováno před i po zpracování, aby byla zaručena stabilita transplantátu.

Příjemcem darovaného lidského střevního mikrobiomu bylo pět kolonií 3-4 týdny starých GF NOD myších samic (15-20 myší na kolonii). Myši byly kolonizovány perorálně, per rektum i přímou inokulací na srst. Šestá kolonie 20 myší byla ponechána bezmikrobní. Sterilita kolonií byla verifikována kultivací a panbakteriální PCR každých 14 dní před přenosem. Myši byly chovány ve sterilních izolátorech a krmeny ad libitum stravou ozářenou 50 kGy. U myší byla každý týden sledována incidence diabetu, přičemž

myši, jejichž glykémie překročila 12 mmol/l byly považovány za diabetické. Vzorky stolice myší byly získány každých 14 dní a zpracovány a analyzovány procesem popsaným v kapitole 8.2.3.

Ve věku 12-13 týdnů bylo z 3 kolonizovaných skupin (v dalších skupinách nebyl dostatečný počet myší) a GF NOD skupiny utraceno 4-6 myší a jejich Langerhansovy ostrůvky byly barveny hematoxylinem a eozinem na skórování inzulitidy. Buněčné suspenze ze sleziny, pankreatických, mezenteriálních a ingvinálních lymfatických uzlin byly dále použity na analýzu T regulačních lymfocytů pomocí průtokové cytometrie (viz výše).

8.3. Statistická analýza

Data byla analyzována per-protokol – do analýzy bylo zahrnuto 39 pacientů, kteří dokončili sledování (20 v GFD skupině a 19 v kontrolní skupině). Deskriptivní analýza skupin byla provedena pomocí Welchových t-testů (souvislé proměnné) nebo Fischerových exaktních testů (binární proměnné). Primární analýza byla provedena za pomoci lineárně regresních modelů adjustovaných na vstupní HbA1c, dávku inzulinu, AUC C-peptidu, pohlaví, věk při diagnóze T1D a SD hmotnosti (model A). Longitudinální analýza byla provedena pomocí lineárních zevšeobecněných odhadovacích rovnic (generalized estimating equations, GEE) s nezávislou strukturou. Lineární trendy v průběhu 12 měsíců byly odhadnuty pro intervenční skupiny a adjustovány na pohlaví, věk při diagnóze T1D a SD hmotnosti (model B).

Analýzy jídelníčků, kontinuálního monitorování glykémie a dotazníků kvality života byly provedeny pomocí dvojvzorkových Welchových t-testů.

K analýze celkových vztahů mezi střevními mikrobiálními komunitami u pacientů v GFD resp. kontrolní skupině bylo použito permutační analýzy variance (PERMANOVA) při použití Bray-Curtisovy vzdálenosti. α-diverzita byla posuzována pomocí standardních indexů za využití Welchova t-testu. Relativní četnost bakterií jsme mezi skupinami porovnávali pomocí Waldova testu v balíčku DESEq2.

Porovnání sérových koncentrací zonulinu a exkrečního poměru laktulózy a mannitolu bylo provedeno pomocí Welchova t-testu. Longitudinální analýza zonulinu byla provedena pomocí lineárních GEE s nezávislou strukturou adjustovaných na pohlaví, věk a SD hmotnosti.

K statistické analýze rozdílů mezi subtypy lymfocytů a následné tvorbě grafů byl použit software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornie, USA). K porovnání mezi skupinami bylo užito nepárového t-testu, přičemž hodnota p <0,05 byla považována za statisticky významnou.

K analýze rozdílů v incidenci diabetu u myších kolonií a tvorbě Kaplan-Meierova grafu bylo použito balíčku survminer v R. K porovnání kolonií jsme použili log-rank test s Benjamini-Hochbergovou korekcí na počet měření.

9. Výsledky

9.1. Zbytková kapacita β-buněk

V obou skupinách došlo během 12 měsíců ve studii ke statisticky významnému poklesu AUC C-peptidu. Ve 12 měsících činil rozdíl AUC C-peptidu mezi pacienty v GFD skupině a kontrolami 205 pmol/L (95 % CI -223 až 633; p = 0,34) (statistický model A). Při longitudinální analýze všech tří časových bodů klesal C-peptid pomaleji v GFD skupině s rozdílem v trendech 409 pmol/l/rok (p = 0,04) (statistický model B) **(Tabulka 5, Obrázek 7a).**

Tabulka 5 Výsledky ve 12 měsících po diagnóze T1D

	GFD	**SD**	**Neadjustovaný rozdíl v průměrech**	**Adjustovaný rozdíl ve změnách**	**95 % CI pro rozdíl ve změnách**	**Adjustované *p***
AUC C-peptidu (pmol/l)	1539 (1255)	1173 (1006)	367	205	-223 až 633	0,3365
Lačný C-peptid (pmol/l)	260 (227)	207 (160)	53	25	-70 až 120	0,5943
HbA1c (mmol/mol)	44,0 (9,5)	52,2 (10,6)	-8,2	-7,8	-14,1 až -1,6	0,0154*
HbA1c (%)	6,2 (0,9)	6,9 (1,0)	-0,8	-0,7	-1,4 až -0,1	
Inzulinová dávka (j/kg/den)	0,50 (0,22)	0,75 (0,34)	-0,25	-0,15	-0,31 až 0,01	0,0673
IDAA1c	8,20 (1,31)	9,93 (1,99)	-1,73	-1,37	-2,41 až -0,34	0,0111*

Výsledky pacientů, kteří dokončili celý rozsah trvání studie ve 12 měsících, data jsou zobrazena jako průměr (SD). *P* hodnoty jsou adjustované na věk, pohlaví, SD hmotnosti a vstupní AUC C-peptidu, inzulinovou dávku, HbA1c a IDAA1c. Statisticky významný rozdíl je znázorněn hvězdičkou *p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001

AUC – plocha pod křivkou, CI – interval spolehlivosti, IDAA1c – na inzulinovou dávku adjustovaný hemoglobin A1c

Rozdíl v lačném C-peptidu byl mezi skupinami ve dvanáctém měsíci 25 pmol/L (95 % CI -70 až 120; $p = 0,59$). Odhadovaný rozdíl v ročních trendech poklesu lačného C-peptidu na základě všech tří časových bodů byl 117 pmol/l/rok ve prospěch GFD skupiny ($p = 0,04$).

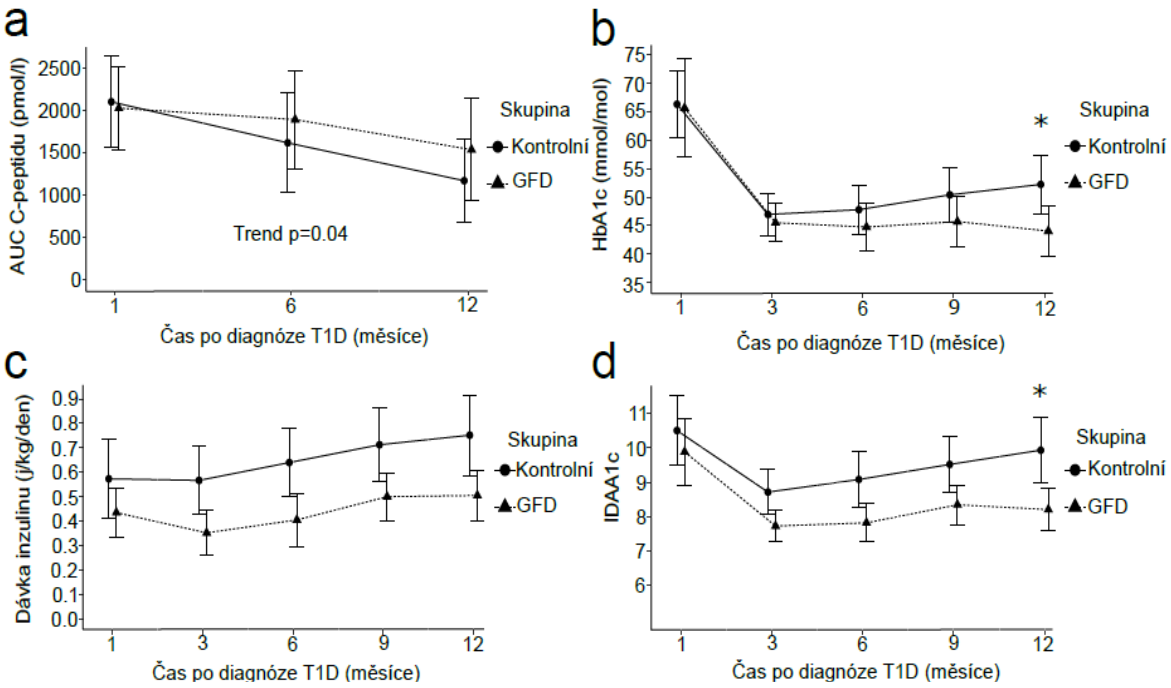
9.2. Metabolická kompenzace, dávka inzulinu a IDAA1c

Ve 12 měsících jsme pozorovali statisticky významně lepší kompenzaci u skupiny na GFD než u skupiny kontrolní s HbA1c nižším o 7,8 mmol/mol (95 % CI -14,1 až -1,6; $p = 0,02$). Rozdíly v dalších bodech měření nebyly po adjustaci na vstupní hodnoty statisticky významné (**Tabulka 5, Obrázek 7b**).

Průměrná denní dávka inzulinu se mezi skupinami během studie významně nelišila. Pacienti v GFD skupině měli ve 12 měsících denní dávky inzulinu průměrně o 0,15 j/kg/den nižší (95 % CI -0,01 až 0,30; $p = 0,07$) (**Tabulka 5, Obrázek 7c**). U tří pacientů v GFD skupině bylo možno insulin z důvodu normoglykémií zcela vysadit po dobu 3, 6 a 10 měsíců. V kontrolní skupině to nebylo možné u žádného z pacientů.

Marker částečné klinické remise IDAA1c byl ve 12 měsících v průměru o 1,37 nižší v GFD skupině (95 % CI -2,41 až -0,34; $p = 0,01$). V této době splnilo kritérium pro částečnou remisi IDAA1c ≤9 71 % pacientů v GFD skupině oproti pouze 32 % pacientů v kontrolní skupině ($p = 0,03$). Rozdíly v dalších bodech měření nebyly po adjustaci na vstupní hodnoty statisticky významné (**Tabulka 5, Obrázek 7d**).

Obrázek 7 Hlavní výsledky klinických parametrů ve všech časových bodech u GFD (čárkovaná) a kontrolní (plná) skupiny.



Data jsou zobrazena jako průměry (SD), AUC C-peptidu (a), HbA1c (b), dávka inzulinu (c) a IDAA1c (d). Statisticky významný rozdíl je znázorněn hvězdičkou *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001

9.3. Dodržování bezlepkové diety, rozbor jídelníčků a dotazníky kvality života

Imunogenní peptidy lepku byly nalezeny ve stolici čtyř pacientů v GFD skupině – všichni čtyři pacienti byli následně z analýzy vyřazeni. Detekovatelné množství imunogenních peptidů lepku bylo detekováno ve všech testovaných vzorcích v kontrolní skupině. Skupiny se významně nelišily v příjmu energie ani v žádném z mikro- a makronutrientů v 6 ani 12 měsících (**Tabulka 6**). Udávaná kvalita života se ve 12 měsících mezi skupinami nelišila a to ani v sebe-reportovaných (p= 0,70) ani proxy-reportovaných dotaznících (p= 0,60) (**Tabulka 7 a 8**).

Tabulka 6 Denní příjem energie a živin pacientů v 6 a 12 měsících

Složka stravy	GFD v 6 měsících	Kontroly v 6 měsících	*p*-hodnota	GFD ve 12 měsících	Kontroly ve 12 měsících	*p*-hodnota
Energie (kJ)	7880 (1870)	8084 (1043)	0,72	7909 (1855)	7655 (1767)	0,72
Sacharidy (g)	208,4 (60,5)	215,5 (46,0)	0,72	218,0 (56,4)	207 (42,7)	0,58
Energie ze sacharidů (%)	44,1 (6,4)	44,5 (6,7)	0,86	46,1 (5,7)	45,6 (4,1)	0,80
Jednoduché sacharidy (g)	55,7 (23,6)	63,2 (23,9)	0,39	62,1 (23,8)	62,8 (20,7)	0,93
Energie z jednoduchých sacharidů (%)	12,2 (5,5)	13,2 (5,5)	0,63	13,2 (4,5)	14,7 (6,3)	0,47
Polysacharidy (g)	151,7 (55,9)	152,1 (42,4)	0,98	155,8 (45,5)	144,1 (51,1)	0,53
Energie z polysacharidů (%)	32,9 (8,5)	31,2 (6,4)	0,54	32,9 (5,2)	30,9 (6,1)	0,365
Tuky (g)	81,7 (20,6)	83,0 (17,7)	0,86	79,8 (22,0)	77,1 (22,6)	0,75
Energie z tuků (%)	39,2 (5,0)	38,5 (6,2)	0,76	37,9 (4,2)	36,7 (5,2)	0,50
Nasycené tuky (g)	17,6 (7,9)	19,1 (7,5)	0,61	17,5 (8,7)	20,4 (9,6)	0,42
Energie z nasycených tuků (%)	8,5 (4,8)	8,8 (2,9)	0,84	8,5 (4,3)	9,8 (3,8)	0,41

MUFA (g)	10,0 (6,6)	10,3 (5,5)	0,89	8,0 (5,4)	7,6 (4,6)	0,82
Energie z MUFA (%)	4,5 (2,4)	4,7 (2,5)	0,84	3,86 (2,4)	3,7 (2,3)	0,86
PUFA (g)	3,7 (2,3)	4,2 (2,3)	0,58	3,3 (2,3)	3,6 (2,6)	0,76
Energie z PUFA (%)	1,7 (0,88)	1,9 (1,1)	0,55	1,6 (0,9)	1,8 (1,2)	0,61
Cholesterol (mg)	250,9 (132,0)	179,5 (93,1)	0,11	175,0 (117,9)	223,6 (128,3)	0,31
Bílkoviny (g)	79,0 (20,5)	80,7 (10,7)	0,78	75,4 (22,5)	78,0 (20,6)	0,75
Energie z bílkovin (%)	16,8 (2,5)	16,9 (2,7)	0,925	15,9 (2,8)	17,1 (2,4)	0,28
Vláknina (g)	13,9 (6,2)	11,7 (4,7)	0,29	15,5 (8,1)	12,6 (3,9)	0,28

Data jsou zobrazena jako průměry (SD). Statisticky významný rozdíl je znázorněn hvězdičkou *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001

MUFA – mononenasycené mastné kyseliny, PUFA – polynenasycené mastné kyseliny

Tabulka 7 Kvalita života dle hodnocení pacientů

Doména	Bezlepková dieta	Standardní dieta	95 % CI*	*p*-hodnota
Symptomy diabetu	70,95	68,82	-8,86 až 13,11	0,69
Překážky v léčbě	77,70	79,76	-11,39 až 7,26	0,65
Dodržování léčby	88,75	87,13	-5,75 až 8,99	0,66

Obavy	75,13	77,38	-15,39 až 10,89	0,73
Komunikace	88,00	83,25	-5,98 až 15,48	0,37
Celkové skóre	77,20	75,56	-6,14 až 9,01	0,70

Data jsou zobrazena jako průměry skórů. Statisticky významný rozdíl je znázorněn hvězdičkou *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001

CI – interval spolehlivosti

Tabulka 8 Kvalita života dle hodnocení rodičů/zákonných zástupců

Doména	Bezlepková dieta	Standardní dieta	95 % CI*	*p*-hodnota
Symptomy diabetu	73,33	73,31	-7,64 až 7,68	0,99
Překážky v léčbě	77,70	79,76	-11,39 až 7,26	0,65
Dodržování léčby	88,75	87,13	-5,75 až 8,99	0,66
Obavy	69,24	68,31	-18,61 až 20,46	0,92
Komunikace	75,33	80,63	-19,89 až 9,30	0,47
Celkové skóre	74,90	76,69	-8,61 až 5,05	0,60

Data jsou zobrazena jako průměry skórů. Statisticky významný rozdíl je znázorněn hvězdičkou *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001

CI – interval spolehlivosti

9.4. Kontinuální monitoring glykémií

Průměrná glykémie zjištěná zaslepenou monitorací ve 12 měsících se u pacientů v jednotlivých skupinách nelišila (7,7 mmol/l GFD skupina vs 7,4 mmol/l kontrolní skupina, p = 0,69). Průměrná směrodatná odchylka všech měřených glykémií byla 2,6 mmol/l u GFD a 2,8 mmol/l u kontrolní skupiny (p = 0,46) a variační koeficient byl 33,2 % v GFD a 36,8 % v kontrolní skupině (p = 0,27). Pacienti v GFD skupině byli 72,8 % času v cílovém rozmezí v porovnání s 66,6 % v kontrolní skupině (p = 0,40). Čas strávený v hypoglykémii se mezi skupinami významně nelišil: 6,5 % v GFD skupině a 8,3 % v kontrolní skupině (p = 0,52) (**Tabulka 9**).

Tabulka 9 Výsledky z kontinuálního monitoringu glukózy

	Bezlepková dieta (n = 18)	**Standardní dieta (n = 16)**	***p*-hodnota**
Počet měření	1857	1740	0,27
Průměrná glykémie (mmol/l)	7,7	7,4	0,69
Směrodatná odchylka glykémie (mmol/l)	2,6	2,8	0,46
Variační koeficient (%)	33,2	36,84	0,27
Čas v cílovém rozmezí (3,9–10 mmol/l) (%)	72,8	66,6	0,40
Čas v hypoglykémii (<3,9 mmol/l) (%)	6,5	8,3	0,52

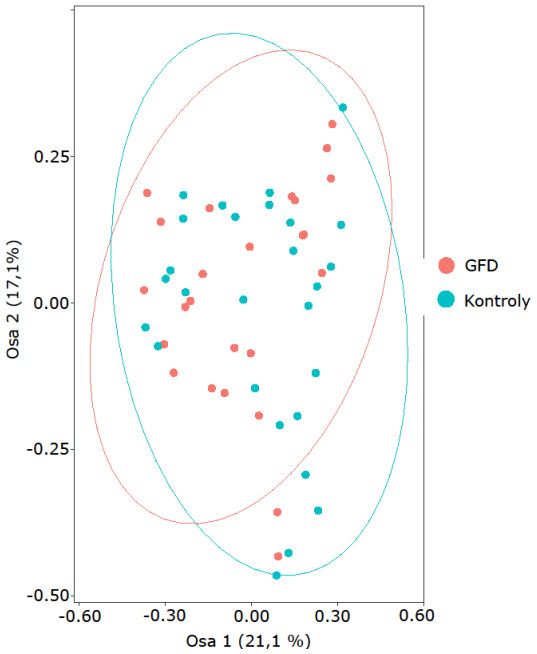
Data jsou zobrazena jako průměry. Statisticky významný rozdíl je znázorněn hvězdičkou *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001

9.5. Složení střevního mikrobiomu před a během intervence GFD

Analýza mikrobiálního složení byla provedena celkem na 247 vzorcích od 41 pacientů (22 GFD, 19 kontrol). Dva z pacientů na GFD nedokončili celou studii nicméně jejich vzorky před ukončením GFD byly pro analýzu použity.

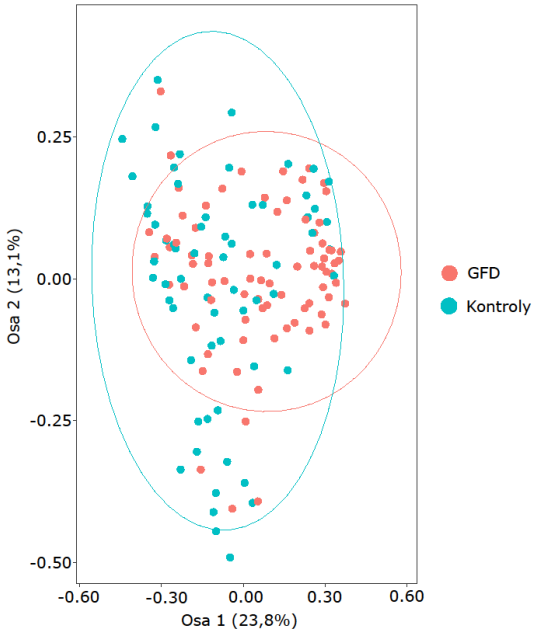
Před zahájením GFD se skupiny bakteriálním složením stolice významně nelišily (p = 0,35) (**Obrázek 8**), ovšem během intervence se skupiny začaly významně lišit (p <0,001). Výsledek byl získán permutační analýzou variance (ANOVA) Bray-Curtisovy vzdálenosti, přičemž první dvě osy vysvětlovaly 23,8 % a 13,1 % rozdílu (**Obrázek 9**). Taxa zodpovědná za rozdílné složení byla následující: na úrovni kmene byl kmen Actinobacteria významně méně četný v GFD skupině ($p = 4{,}12\text{x}10^{-8}$); na úrovni rodu byl rod *Bifidobacterium* méně zastoupen v GFD skupině, naopak rody *Roseburia* ($p = 3{,}29\text{x}10^{-4}$), *Lachnospira* ($p = 5{,}76\text{x}10^{-5}$) and *Ruminococcaceae_UCG-013* ($p = 5{,}76\text{x}10^{-5}$) z kmene Firmicutes byly výrazně četnější v GFD skupině.

Obrázek 8 Analýza hlavních komponent vzorků před zahájením intervence



Zobrazeno 52 vzorků získaných před 1. MMT testem (před zahájením intervence v GFD skupině). První dvě osy vysvětlují 21,1 % a 17,1 % diverzity. Skupiny se významně nelišily (p= 0,35) v permutační analýze variance Bray-Curtisovy vzdálenosti.

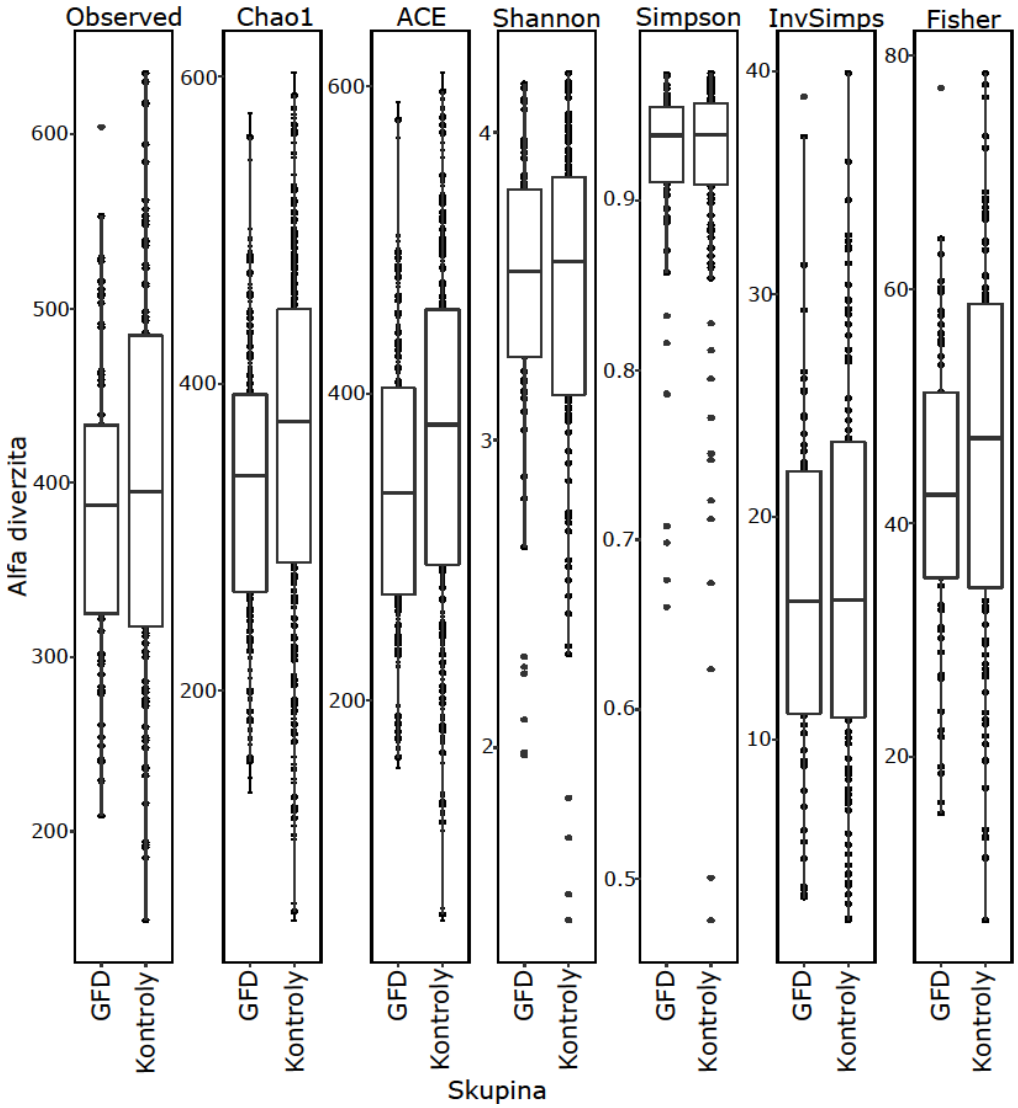
Obrázek 9 Analýza hlavních komponent vzorků během intervence



Zobrazeno 142 vzorků získaných během intervence (po dobu dodržování intervence v GFD skupině). První dvě osy vysvětlují 23,8 % a 13,1 % diverzity. Skupiny se statisticky významně lišily (p <0,001) v permutační analýze variance Bray-Curtisovy vzdálenosti.

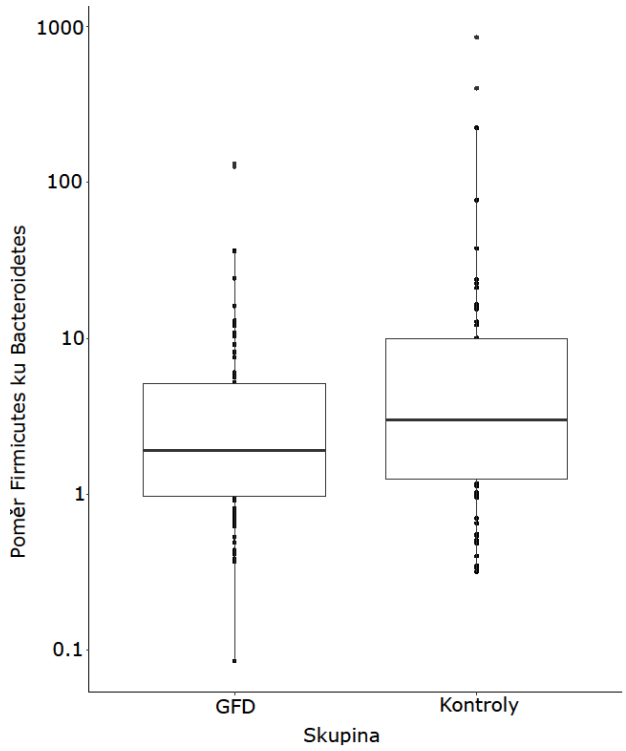
V indexech α-diverzity (**Obrázek 10**) ani v poměru kmene Firmicutes ku Bacteroidetes změny pozorovány nebyly (p= 0,2) (**Obrázek 11**).

Obrázek 10 Porovnání α-diverzity během intervence



Skupiny se statisticky významně nelišily v žádném ze sledovaných indexů α-diverzity.

Obrázek 11 Poměr kmenů Firmicutes ku Bacteroidetes během intervence

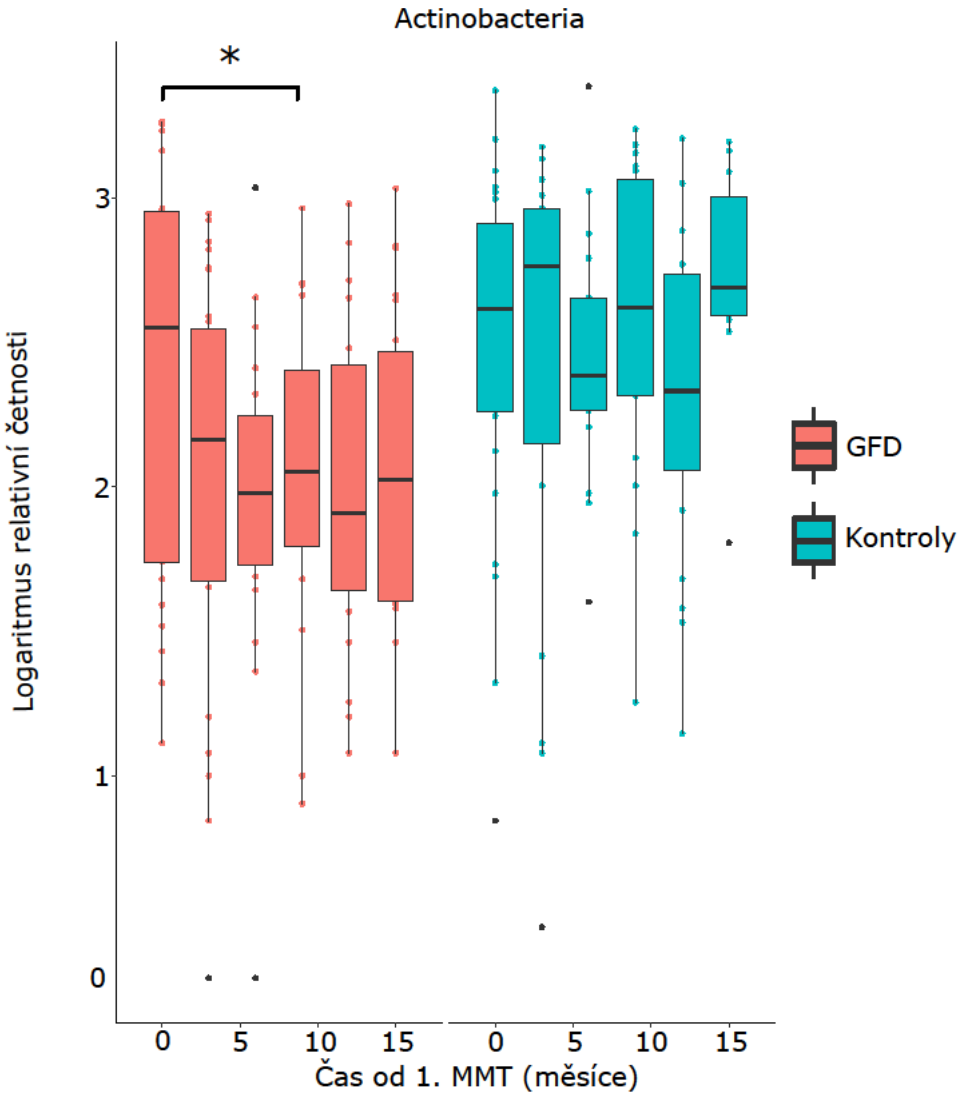


Skupiny se mezi sebou statisticky významně nelišily (p= 0,2).

9.6. Změny mikrobiomu po zavedení GFD

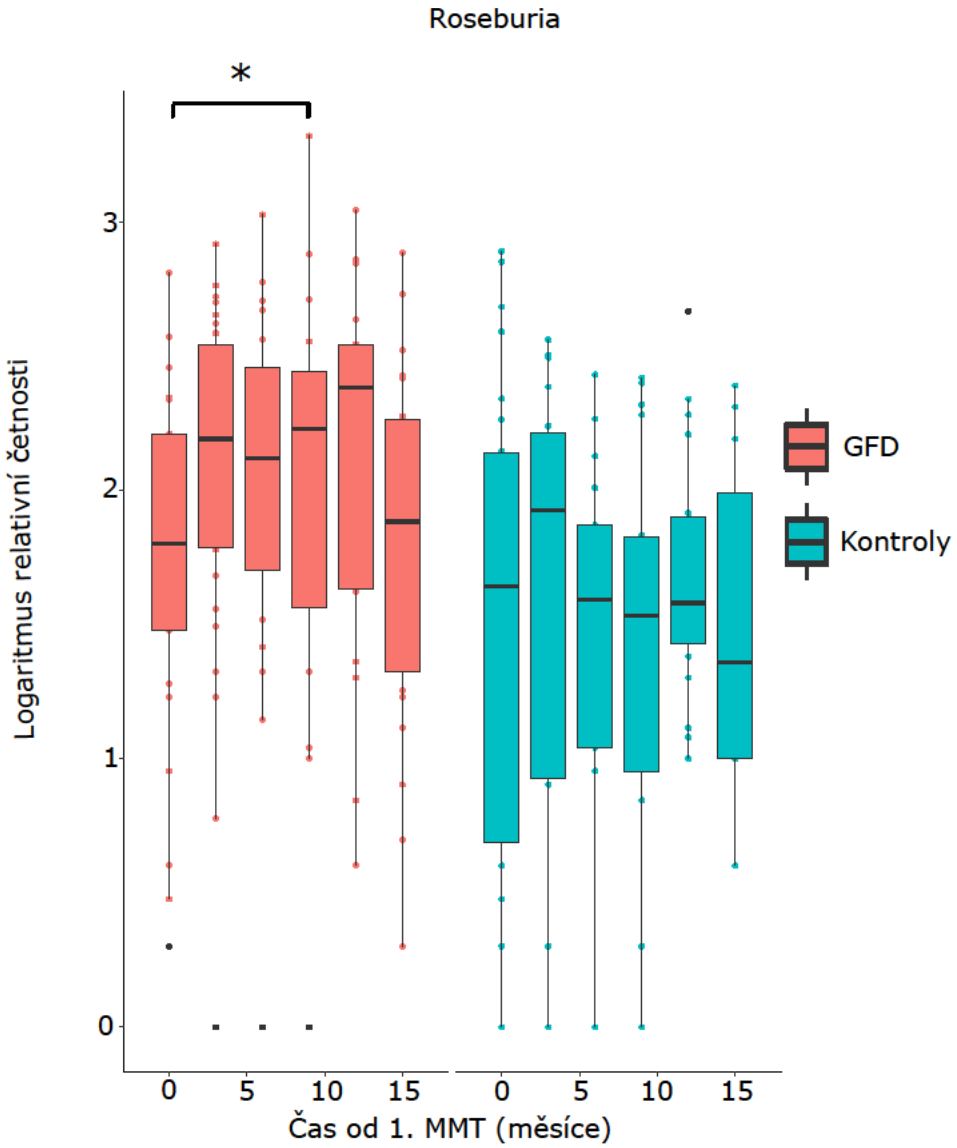
Složení střevních bakterií se významně změnilo po zavedení GFD (p = 0.002), přičemž míra odpovědi na dietní změnu byla mezi pacienty rozdílná (p <0.001). Na úrovni kmene došlo k významnému poklesu v kmeni Actinobacteria v GFD skupině (p=5,46x10^{-3}) **(Obrázek 12)**. Na úrovni rodu jsme po zavedení GFD pozorovali vzestup v zastoupení rodu *Roseburia* (p = 0,015) **(Obrázek 13)** a pokles v četnosti rodů *Collinsella* (p=3,89x10^{-3}) **(Obrázek 14)**, *Bifidobacterium* (p= 6,80x10^{-3}), *Intestinibacter* (p=3,20x10^{-2}) **(Obrázek 15a)**, *Romboutsia* (p=2,90x10^{-2}) **(Obrázek 15b)** a *Terrisporobacter* (p=4,49x10^{-2}) **(Obrázek 15c)**. Na úrovni druhů tyto změny odpovídají změnám v druzích *Roseburia inulinivorans, Collinsella aerofaciens*, *Bifidobacterium adolescentis, Romboutsia timonesis/ilealis, Intestinibacter bartletti* and *Terrisporobacter othiniensis*. V kontrolní skupině jsme žádné změny ve stejné době (tj. mezi vzorky před obdobím kdy byla u GFD skupiny zahájena dieta a poté) nepozorovali (p= 0,180).

Obrázek 12 Vývoj logaritmu relativní četnosti kmene Actinobacteria v čase



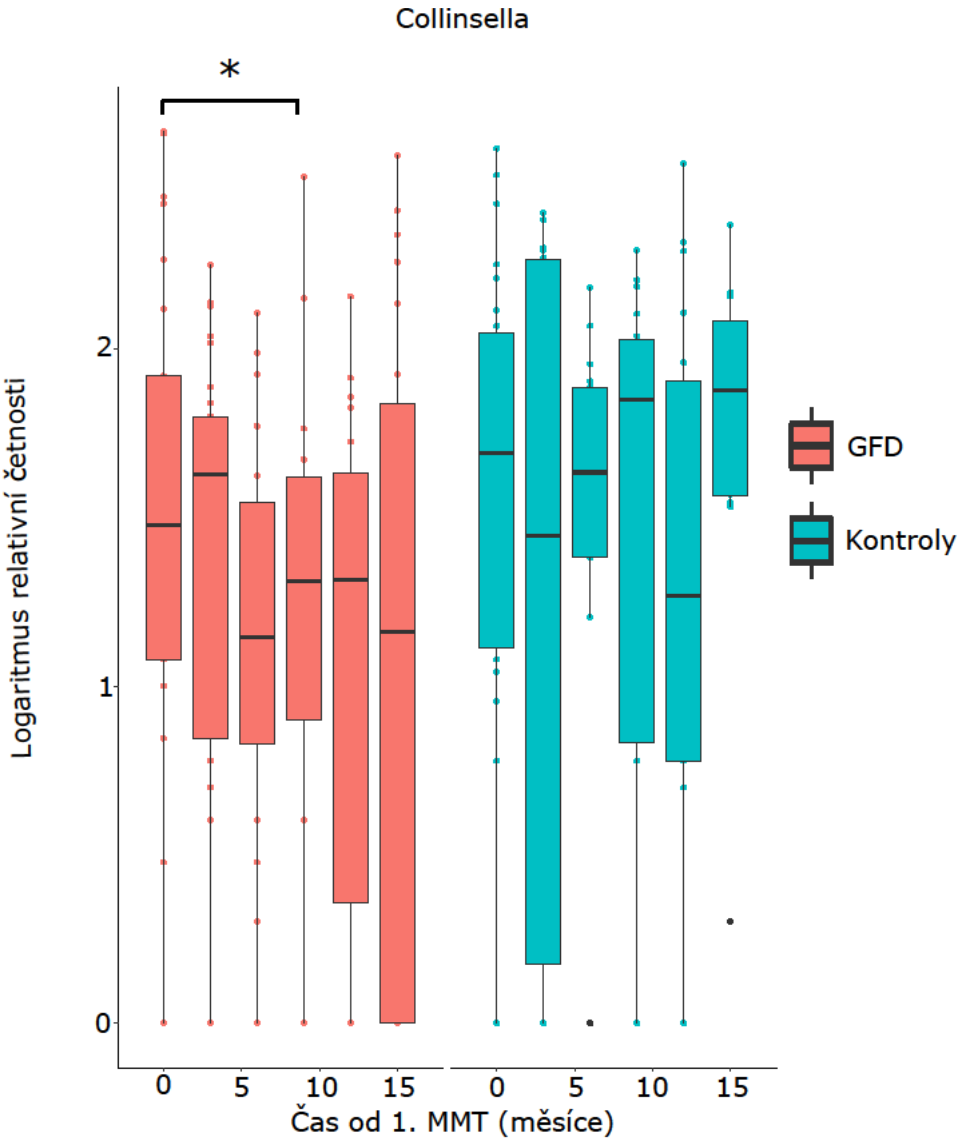
V intervenční skupině došlo po zavedení GFD ke statisticky významnému poklesu v četnosti kmene Actinobacteria ($p = 5{,}46 \times 10^{-3}$).

Obrázek 13 Vývoj logaritmu relativní četnosti rodu *Roseburia* v čase



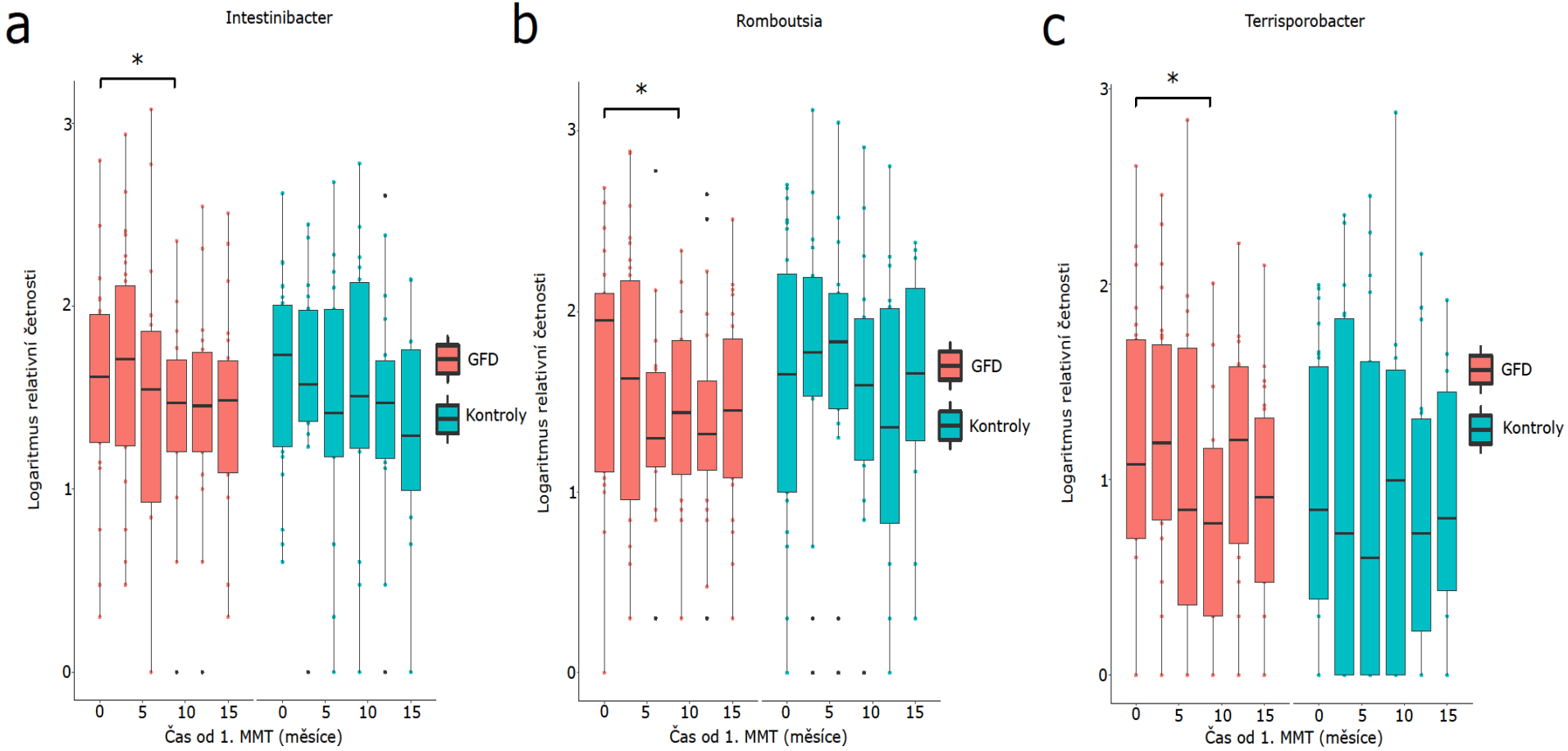
V intervenční skupině došlo po zavedení GFD ke statisticky významnému zvýšení četnosti rodu *Roseburia* ($p = 0{,}015$).

Obrázek 14 Vývoj logaritmu relativní četnosti rodu *Collinsella* v čase



V intervenční skupině došlo po zavedení GFD ke statisticky významnému poklesu v četnosti rodu *Collinsella* ($p = 3{,}89 \times 10^{-3}$).

Obrázek 15 Vývoj logaritmu relativní četnosti rodů *Intestinibacter* (a), *Romboutsia* (b) *a Terrisporobacter* (c) v čase



V intervenční skupině došlo po zavedení GFD ke statisticky významnému poklesu v četnosti rodů *Intestinibacter* (p= 3,20x10^{-2}), *Romboutsia* (p= 2,90x10^{-2}) a *Terrisporobacter* (p= 4,49 x10^{-2}).

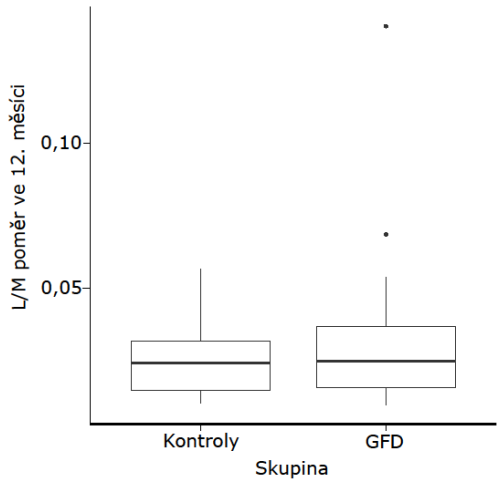
Složení střevních bakterií se významně nezměnilo po ukončení GFD diety (p= 0,129) ani ve stejném období u kontrolní skupiny (p= 0,741).

Zavedení ani ukončení GFD v intervenční skupině nevedlo k významně změně v žádném z indexů α-diverzity. Stejně tak neovlivnilo zavedení GFD ani její ukončení poměr Firmicutes ku Bacteroidetes (p = 0,543), (p = 0,154).

9.7. Střevní propustnost

Poměr laktulózy a mannitolu (L/M) v moči byl testován u 16 pacientů v GFD a 17 pacientů v kontrolní skupině před ukončením intervence ve dvanáctém měsíci. Skupiny se významně nelišily – průměr v GFD skupině byl 0,035±0,032 a v kontrolní skupině 0,026±0,013 (p = 0,321) (**Obrázek 16**). Byla pozorována slabá korelace mezi poměrem laktulózy a mannitolu v moči a HbA1c (r = 0,315) a slabá negativní korelace s SD BMI (r = -0,280). Nebyla pozorována korelace mezi poměrem L/M a dávkou inzulinu (r = -0,140) nebo IDAA1c (r = 0,067) (**Tabulka 10**). Odhadovaný efekt GFD na L/M poměr ve dvanáctém měsíci posuzovaný pomocí lineárně regresního adjustovaného modelu byl 0,013 (95 % CI -0,007 až 0,033; p = 0,199).

Obrázek 16 Poměr laktulózy ku mannitolu v moči u pacientů ve 12 měsících



Skupiny se mezi sebou statisticky významně nelišily (p= 0,0321).

Tabulka 10 Korelace L/M poměru v moči ve 12. měsíci a vybraných klinických parametrů

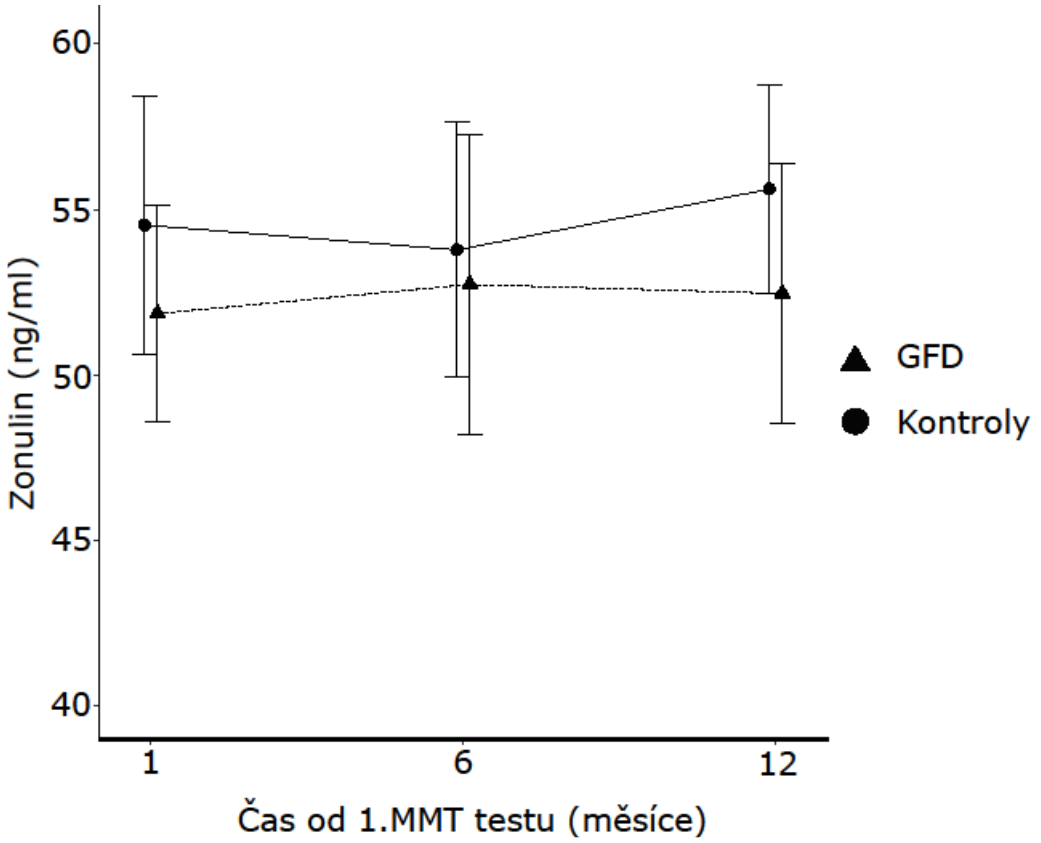
	Pearsonův korelační koeficient
BMI SD	-0,28
HbA1c	0,32
Dávka inzulinu	-0,14
IDAA1c	0,07

Slabá pozitivní korelace byla pozorována mezi L/M poměrem a HbA1c, slabá negativní korelace mezi L/M poměrem a SD BMI.

IDAA1c – na inzulinovou dávku adjustovaný hemoglobin A1c

Analýza hladin sérového zonulinu pro všechny časové body byla k dispozici pro 16pacientů v GFD skupině a 18 pacientů v kontrolní skupině. Koncentrace sérového zonulinu byla marginálně nižší u kontrolní skupiny ve všech časových bodech, nicméně nikdy nedosáhla statistické významnosti. Rozdíl v průměrech byl 2,68 ng/ml (95 % CI -7,58 až 2,23; p = 0,275) v prvním měsíci, -1,04 ng/ml v šestém (95 % CI -6,79 až 4,71; p= 0,714) a -3,16 ng/ml ve dvanáctém měsíci (95 % CI -8,04 až 1,72; p = 0,197) (**Obrázek 17**). Odhadovaný efekt GFD na hladinu sérového zonulinu ve dvanáctém měsíci posuzovaný pomocí lineárně regresního adjustovaného modelu byl -3,04 ng/ml (95 % CI -8,50 až 2,40; p = 0,260). Při longitudinální analýze všech tří časových bodů (adjustované na pohlaví, věk a SD hmotnosti) byla 12 měsíční změna v GFD skupině 0,49 ng/ml a 1,08 ng/ml v kontrolní skupině. Odhadovaný dvanáctiměsíční efekt GFD na sérovou koncentraci zonulinu byl -0,60 ng/ml (95 % CI -5,71 až 4,52; p= 0,82).

Obrázek 17 - Koncentrace sérového zonulinu ve všech časových bodech u GFD (čárkovaná) a kontrolní (plná) skupiny.

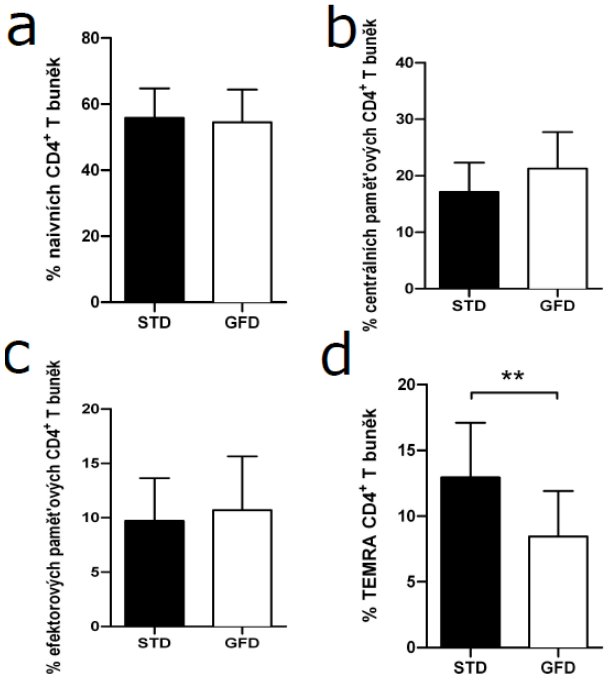


Vertikální čáry zobrazují 95 % interval spolehlivosti. V žádném z časových bodů nebyl pozorován statisticky významný rozdíl.

9.8. Rozdíly v subpopulacích T-lymfocytů

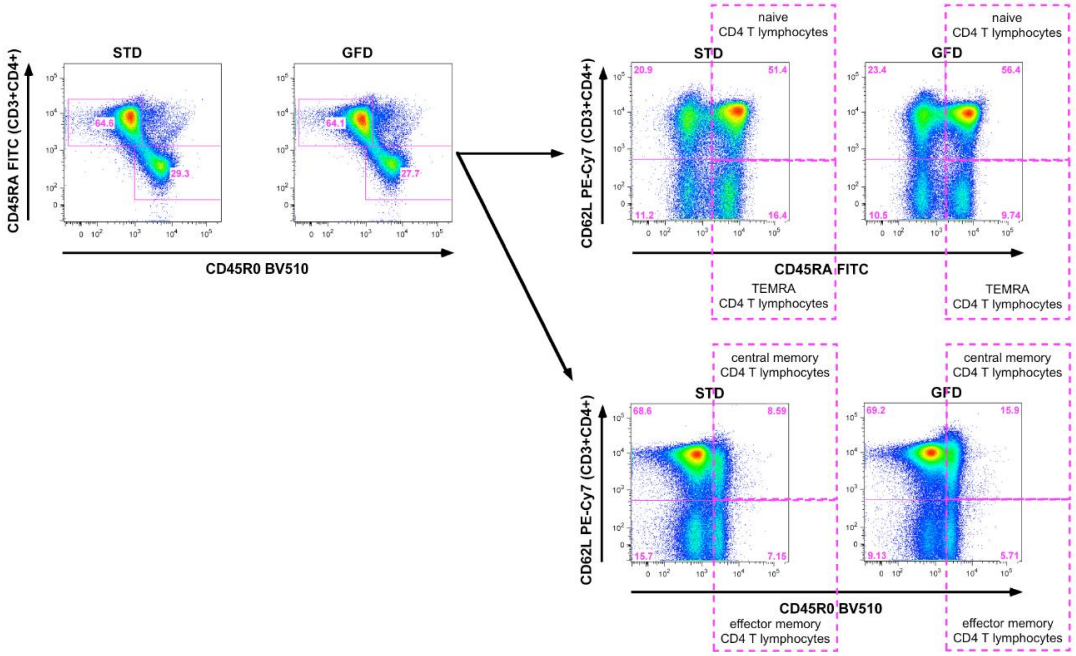
Pacienti na GFD se ve 12 měsících statisticky významně nelišili od pacientů stravujících se standardní stravou ve skupinách naivních (**Obrázek 18a**), centrálních paměťových (**Obrázek 18b**) či efektorových paměťových CD4+ T-lymfocytů (**Obrázek 18c**). Ve skupině na GFD jsme ve 12 měsících pozorovali statisticky významně nižší (p <0,01) zastoupení terminálně diferencovaných efektorových paměťových (TEMRA) CD4+ T-lymfocytů (**Obrázek 18d a 19**). U skupiny na GFD jsme rovněž ve 12 měsících pozorovali signifikantně vyšší (p <0,01) zastoupení T-regulačních lymfocytů typu 1 (**Obrázek 20 a 21a**), z nichž většina produkovala IL-10. V množství T-regulačních lymfocytů typu 1 produkujících IL-10 se skupiny významně nelišily (**Obrázek 21b**).

Obrázek 18 Zastoupení naivních (a), centrálních paměťových (b), efektorových paměťových (c) a TEMRA (d) CD4+ buněk u skupin ve 12 měsících



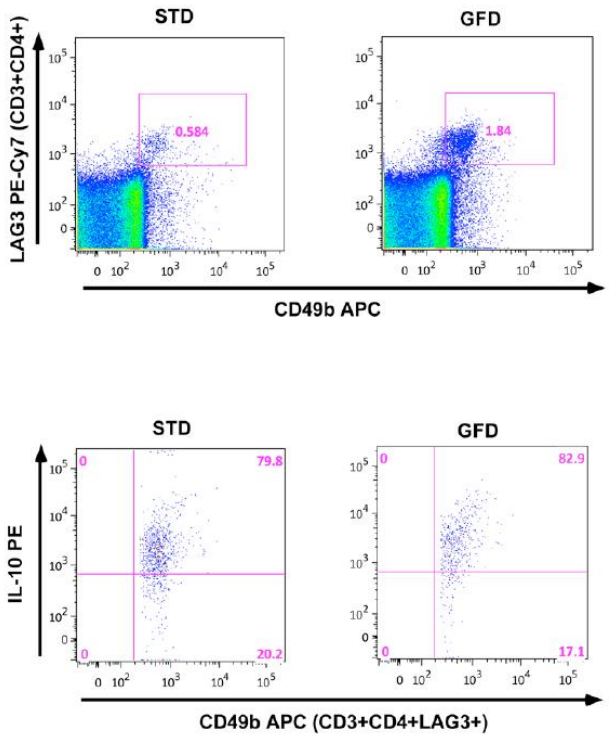
Zastoupení naivních, centrálních paměťových ani efektorových paměťových CD4+ lymfocytů se ve skupinách statisticky významně nelišilo. Naopak množství TEMRA buněk bylo statisticky významně nižší u GFD skupiny. Statisticky významný rozdíl je znázorněn hvězdičkou *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001.

Obrázek 19 Zastoupení různých skupin efektorových buněk (naivních, centrálních efektorových, efektorových paměťových a TEMRA) u pacientů ve studijních skupinách.



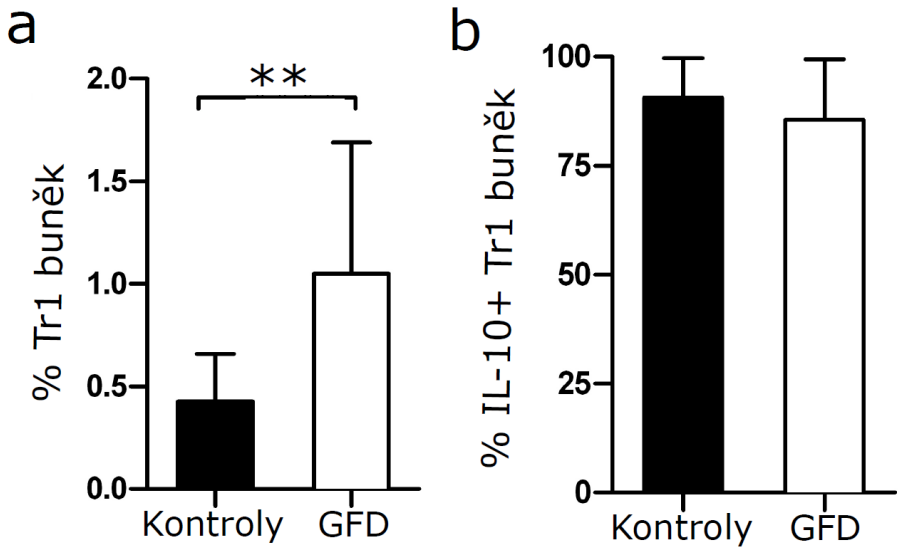
STD – standardní dieta (kontrolní skupina), GFD – bezlepková dieta (intervenční skupina)

Obrázek 20 Zastoupení Tr1 buněk (CD4+CD49b+LAG3+) u pacientů ve studijních skupinách.



STD – standardní dieta (kontrolní skupina), GFD – bezlepková dieta (intervenční skupina)

Obrázek 21 Zastoupení T-regulačních lymfocytů typu 1 (a) a IL-10+ T-regulačních lymfocytů typu 1 (b) u pacientů ve 12 měsících.



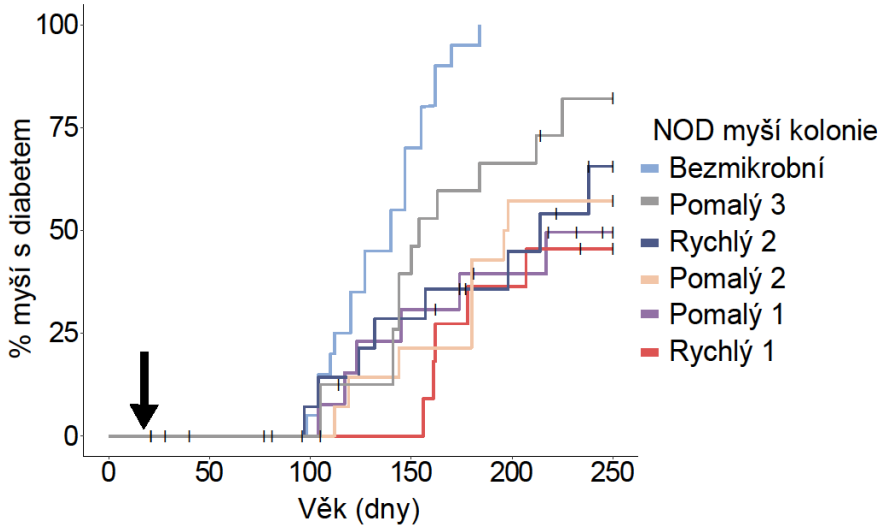
T-regulační lymfocyty typu 1 (Tr1) byly definovány jako CD4+CD49b+LAG3+. Jejich množství bylo statisticky významně vyšší u pacientů na GFD oproti kontrolní skupině. Množství IL-10+ Tr1 buněk se ve skupinách statisticky významně nelišilo. Statisticky významný rozdíl je znázorněn hvězdičkou *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001.

9.9. Přenos lidského střevního mikrobiomu do GF NOD myší

9.9.1. Incidence diabetu

Přenos mikrobiomu byl asociován s nižší incidencí diabetu ve všech kolonizovaných skupinách myší (adjustované *p* v logrank testu od 2 x10^{-4} do 0,025) oproti bezmikrobní skupině myší, v níž byla kumulativní incidence diabetu 100 % do 184. dne od narození. Kolonizované skupiny myší se incidencí diabetu nelišily (všechna adjustovaná *p*> 0,1) nehledě na rychlost progrese ztráty β-buněk dárce (**Obrázek 22**).

Obrázek 22 Kumulativní incidence diabetu v myších koloniích po přenosu mikrobiomu



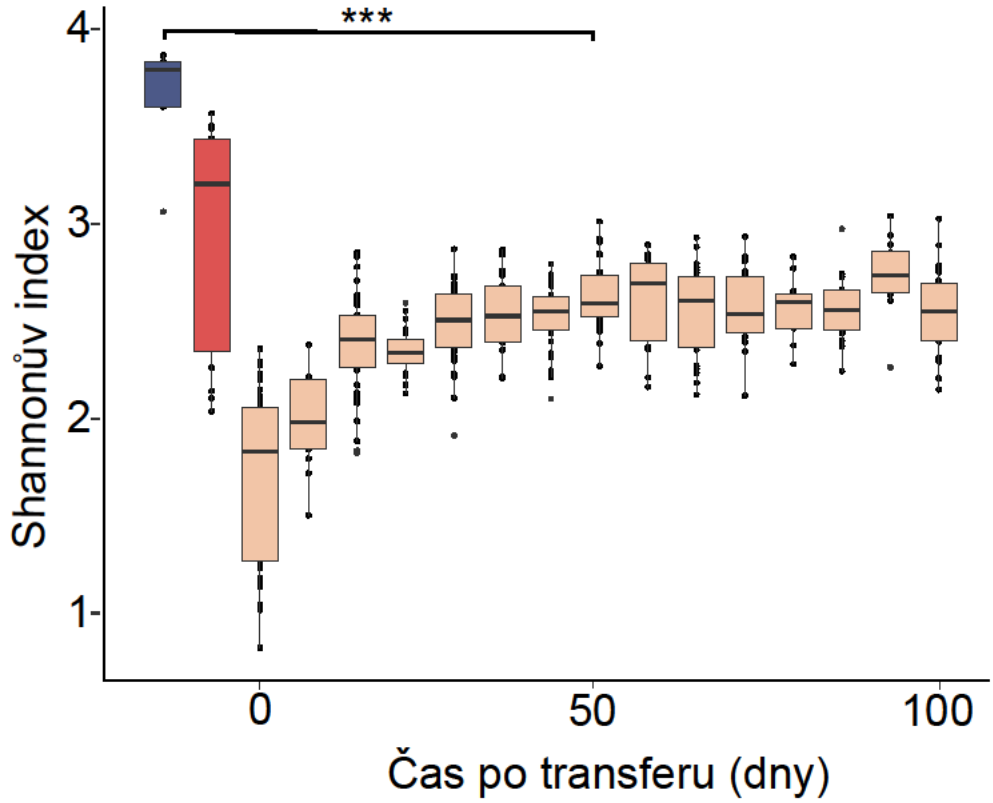
Incidence diabetu v bezmikrobní kolonii se statisticky významně lišila od všech kolonizovaných skupin (*p* <0,025). Kolonizované skupiny se od sebe statisticky významně nelišily bez ohledu na rychlost progrese ztráty β-buněk dárce. Černou šipkou je označen čas přenosu mikrobiomu.

9.9.2. Složení přeneseného mikrobiomu

V porovnání se stolicí dárce i s inokulační směsí po zpracování měly myší stolice významně nižší α-diverzitu (*p* <10^{-5} ve všech indexech diverzity) (**Obrázek 23**). Nejvýznamnější byl pokles α-diverzity v časně post-transplantačních vzorcích, teprve během prvního měsíce došlo k částečnému navýšení, které nicméně nikdy nedosáhlo úrovně α-diverzity dárce. Alfa-diverzita inokulační směsi po zpracování se významně

nelišila od stolice dárce (p = 0,08), což naznačuje, že za pokles je zodpovědná selekce v myším střevě.

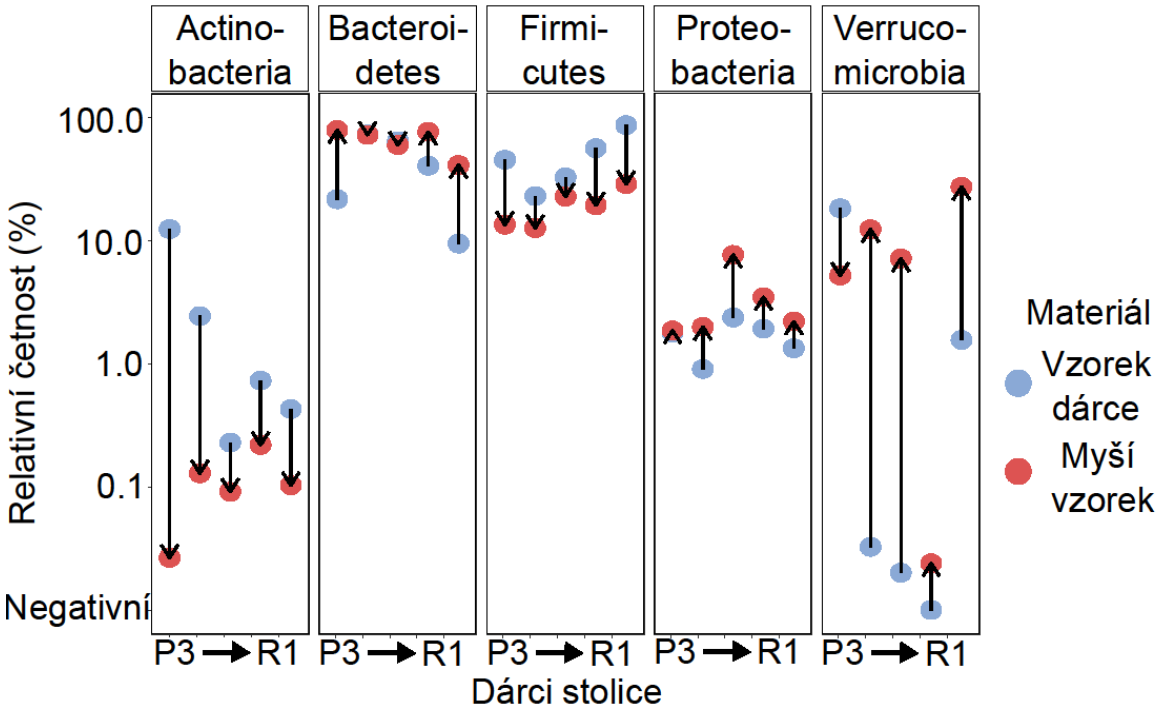
Obrázek 23 Vývoj α-diverzity kolonizovaných myších skupin



Shannonův index α-diverzity během a po přenosu. Vzorek dárce je označen modře, materiál po zpracování červeně a myší stolice v předdefinovaných časových bodech béžově. Statisticky významný rozdíl je znázorněn hvězdičkou *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001.

Porovnání bakteriálního složení mezi dárcem a stolicí myší ve stabilním období po transferu (cca 3-8 týdnů) ukázalo masivní nárůst kmene Bacteroidetes a naopak pokles v četnosti kmene Firmicutes ($\log_e$ poměru Firmicutes/Bacteroidetes mezi myšími vzorky a dárcem p = 0,0033). Výrazný pokles jsme pozorovali také v kmeni Actinobacteria. Změny v četnosti kmene Verrucomicrobia byly výrazné, ale nekonzistentní mezi koloniemi (**Obrázek 24**).

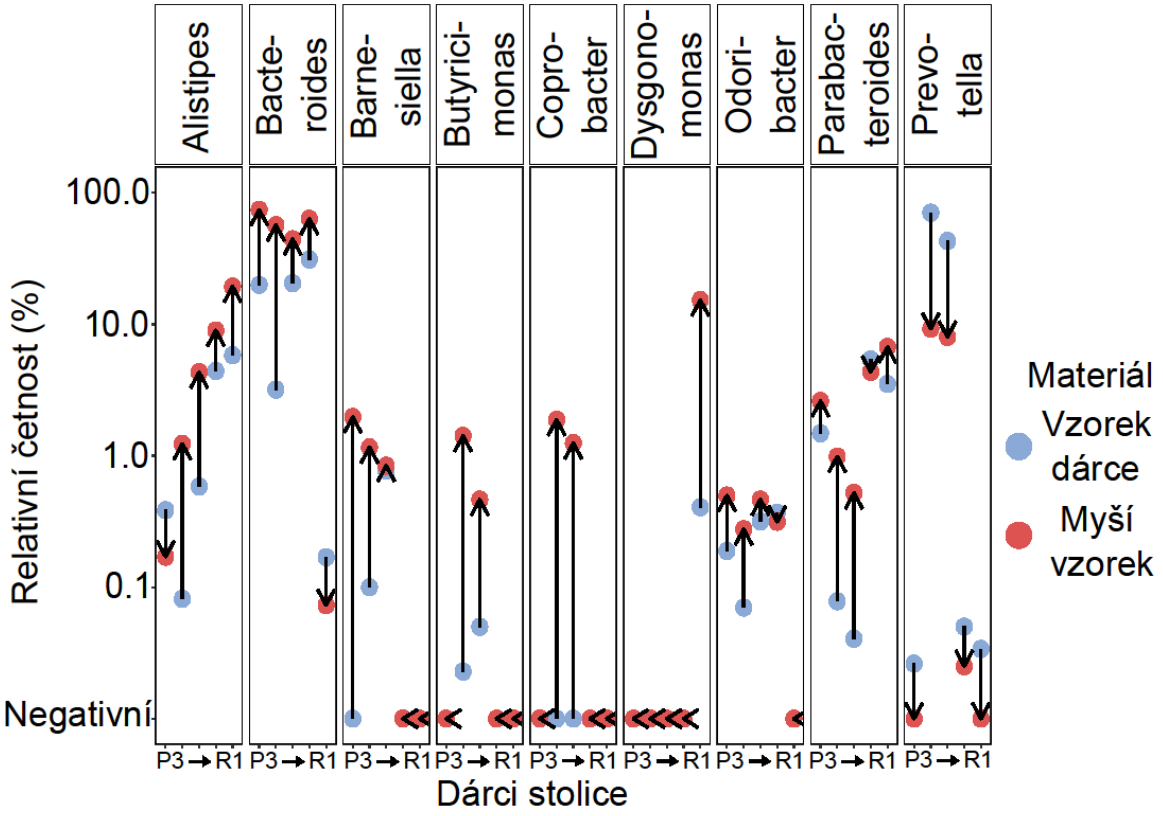
Obrázek 24 Porovnání relativní četnosti bakteriálních kmenů po přenosu



Porovnání relativní četnosti kmenů mezi dárci (modře) a jejich mikrobiomem kolonizovanými myšími skupinami (červeně). Myší data byla získána ze stolic 3-8 týdnů po přenosu. Dárci jsou seřazeni podle incidence myších skupin od nejnižší (Pomalý 3) po nejvyšší (Rychlý 1). Data jsou zobrazena v logaritmické škále.

Na úrovni rodu jsme u všech myších kolonií pozorovali téměř úplné vymizení některých častých lidských taxonů jako *Escherichia coli* nebo *Bifidobacterium*. Změny v četnosti zastoupení rodů velmi prevalentního kmene Bacteroidetes byly četné, nicméně nejevily žádný ustálený vzorec (**Obrázek 25**). Pomocí real-time PCR kvantifikace byla testována přítomnost s diabetem dříve asociovaných druhů *Bacteroides dorei/Bacteroides vulgatus*, přičemž *Bacteroides dorei* byl zachycen v jedné z kolonií (střední incidence diabetu) a *Bacteroides vulgatus* ve všech koloniích vyjma té s nejnižší incidencí diabetu.

Obrázek 25 Porovnání relativní četnosti druhů kmene Bacteroidetes po přenosu



Porovnání relativní četnosti rodů kmene Bacteroidetes mezi dárci (modře) a jejich mikrobiomem kolonizovanými myšími skupinami (červeně). Myší data byla získána ze stolic 3-8 týdnů po přenosu. Dárci jsou seřazeni podle incidence myších skupin od nejnižší (Pomalý 3) po nejvyšší (Rychlý 1). Data jsou zobrazena v logaritmické škále.

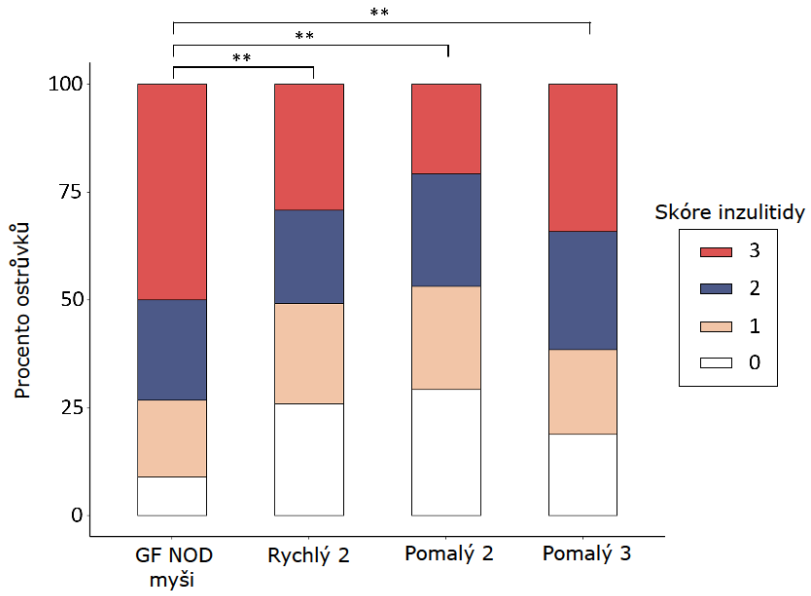
S rychlostí rozvoje diabetu u kolonizovaných myších skupin nebyl asociován žádný typický mikrobiální vzorec. Složení stolice dárců se významně nelišilo ve vztahu k dietě ani k rychlosti progrese T1D.

9.9.2. Inzulitida a T-regulační lymfocyty

Bezmikrobní NOD myší kolonie měla významně vyšší skóre inzulitidy než jakákoliv z kolonizovaných skupin (p <0,01) (**Obrázek 26**). Množství FoxP3+CD25+CD4+ T regulačních lymfocytů nejevilo žádný specifický vzorec mezi slizničními (mezenteriálními a pankreatickými) či tkáňovými (ingvinální, slezinné)

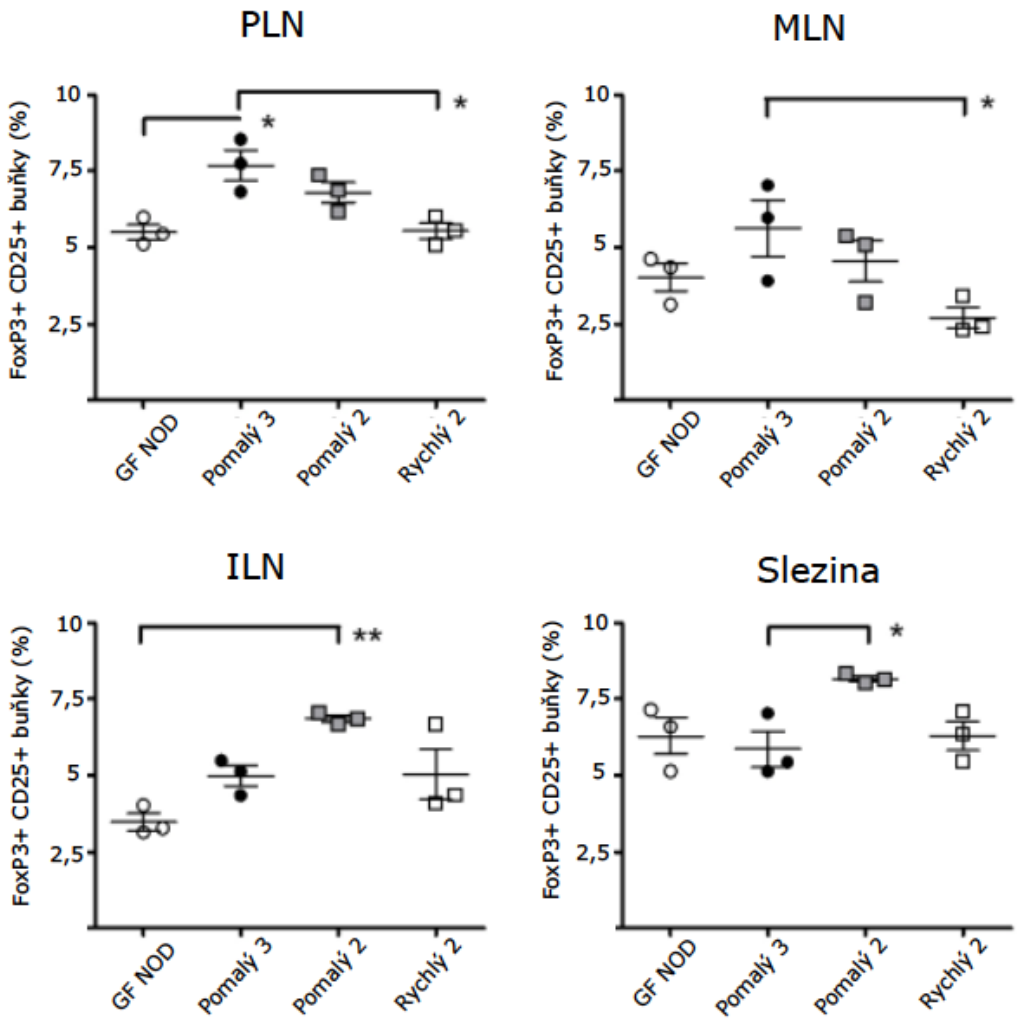
kompartmenty skupin myší kolonizovaných od pacientů s rychlou či pomalou progresí diabetu (**Obrázek 27**). IL10+ T-helper lymfocyty byly četnější ve slezinách kolonizovaných myších skupin (p = 0,009), tento rozdíl nebyl pozorován v mezenteriálních, pankreatických ani ingvinálních uzlinách (**Obrázek 28**).

Obrázek 26 Skóre inzulitidy u myších skupin po přenosu



Porovnání skóre inzulitidy mezi bezmikrobní NOD myší skupinou se skupinami kolonizovanými mikrobiomy lidských dárců. Myší data získána z myší utracených ve 12-13 týdnu. Skóre inzulitidy popsáno v metodách v sekci 8.2.9. Statisticky významný rozdíl je znázorněn hvězdičkou *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001.

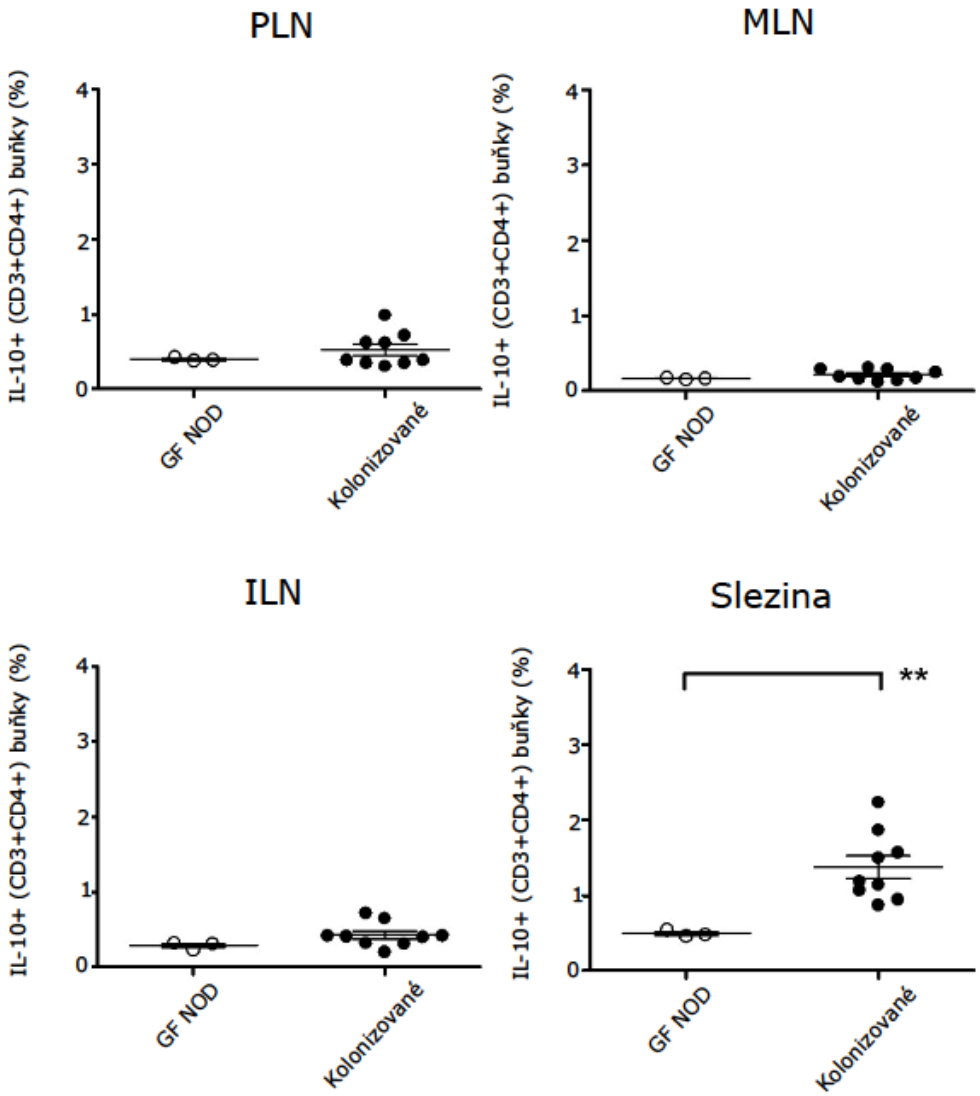
Obrázek 27 Množství FoxP3+CD25+CD4+ T regulačních lymfocytů v lymfatických orgánech skupin myší



Porovnání množství FoxP3+CD25+CD4+ T regulačních lymfocytů v lymfatických orgánech mezi bezmikrobní NOD myší skupinou se skupinami kolonizovanými mikrobiomy lidských dárců. Zastoupení T-lymfocytů nejeví významný vzorec ve vztahu k incidenci diabetu v myších koloniích či slizničnímu/tkáňovému kompartmentu. Data jsou získána z myší utracených ve 12-13 týdnu. Data jsou zobrazena jako průměr (SD). Statisticky významný rozdíl je znázorněn hvězdičkou *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001.

ILN – ingvinální lymfatické uzliny, MLN – mezenteriální lymfatické uzliny, PLN – pankreatické lymfatické uzliny

Obrázek 28 Množství IL-10+ T-helper lymfocytů v lymfatických orgánech skupin myší



Porovnání množství IL-10+ T-helper lymfocytů v lymfatických orgánech mezi bezmikrobní NOD myší skupinou se skupinami kolonizovanými mikrobiomy lidských dárců. Bylo pozorováno statisticky významně vyšší zastoupení těchto buněk ve slezině ve skupinách lidským mikrobiomem kolonizovaných myší. Data jsou získána z myší utracených ve 12-13 týdnu. Data jsou zobrazena jako průměr (SD). Statisticky významný rozdíl je znázorněn hvězdičkou *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001.

ILN – ingvinální lymfatické uzliny, MLN – mezenteriální lymfatické uzliny, PLN – pankreatické lymfatické uzliny

10. Diskuze

Diabetes 1. typu je jedno z nejčastějších chronických onemocnění dětského věku. Představuje značnou zátěž nejen pro pacienty a jejich rodiny, ale také pro celý zdravotnický systém. Důkladné porozumění jeho patogeneze a progrese dává naději na rozvoj nových preventivních a terapeutických možností. Přeložená práce přispívá k poznání úlohy lepku ve stravě dětí s T1D na reziduální kapacitu β-buněk, složení střevního mikrobiomu a imunitní funkce v období jednoho roku bezprostředně následujícího po manifestaci diabetu.

V rámci naší práce jsme komplexně zkoumali asociace bezlepkové diety s celou řadou léčebných i možných patogenetických modalit. V první části studie jsme se zaměřili zejména na klinické parametry kompenzace pacientů s T1D. Z výsledků vyplývá, že GFD je asociována s pomalejší ztrátou zbytkové kapacity β-buněk, lepší metabolickou kompenzací T1D a prodloužením období parciální remise bez toho, že by negativně ovlivňovala kvalitu života pacientů.

Zbytková kapacita β-buněk je klinicky velmi důležitým parametrem, neboť je ve střednědobém horizontu asociována s lepší metabolickou kompenzací T1D (Buckingham *et al.* 2015) a přispívá tak ke snížení rizika akutních (Sorensen *et al.* 2013) i chronických (Steffes *et al.* 2003) komplikací. U tří pacientů zahrnutých do naší studie v GFD větvi bylo navíc dosaženo tzv. kompletní remise, kdy bylo možno dočasně vysadit terapii inzulinem při zachování normální hladiny glykémie. Míra této kompletní remise v intervenční skupině (3/26 = 11,5 %) byla vyšší, než byla dosud popisována v pediatrické populaci T1D pacientů (Abdul-Rasoul *et al.* 2003).

Jedinou další studií, která zkoumala možný vliv GFD na prodloužení období částečné klinické remise krátce po diagnóze T1D pochází od kolektivu autorů z Dánska (Svensson *et al.* 2016). Její závěry se částečně shodují s výsledky naší práce – i zde byla pozorována lepší kompenzace T1D v intervenční skupině a častější částečná remise

onemocnění. Výhodou naší studie bylo použití více homogenní a současné kontrolní skupiny a objektivní kontrola adherence ke GFD. Rozborem pacienty dodaných jídelníčků jsme navíc mohli ověřit, že se mezi sebou skupiny nelišily v žádném z mikro- ani makronutrientů a hlavním rozdílem tak bylo pouze vynechání lepku ve stravě.

Na základě námi publikovaných výsledků nicméně není možné vyvodit kauzalitu, kterou by bylo nutné exaktně potvrdit či vyvrátit randomizovanými studiemi s větším množstvím pacientů. Provedení tohoto typu studie je však velmi obtížné a naráží na těžko překonatelné překážky, které jsme řešili též v první fázi náboru pacientů do tohoto projektu. Dodržování GFD po dobu jednoho roku bezesporu výrazně zasahuje nejen do života dítěte, ale ovlivňuje životní styl celé rodiny, a to v době, kdy její členové ještě nejsou dostatečně sžiti s diagnózou T1D. Nutnost randomizace proto narážela na neochotu rodičů zúčastnit se projektu jako takového, proto jsme se rozhodli studii neprovádět jako randomizovanou, ale nechat volbu na rodičích. To sice snížilo vědecký potenciál studie, ale umožnilo její provedení podle jinak nezměněného designu, který v řadě podprojektů nevyžadoval nutnost randomizace.

V rámci vyšetřování střevního mikrobiomu pacientů během naší studie jsme zjistili, že GFD má potenciál měnit jeho složení. Změny nebyly příliš výrazné, nicméně týkaly se některých bakterií zejména z kmenů Actinobacteria a Firmicutes, jež jsou metabolicky aktivní a mohou mít spojitost s průběhem T1D. Pokles v rodu Bifidobacterium po zavedení GFD byl pozorován již v několika studiích jak u pacientů s céliakií, tak u zdravých jedinců. Tento pokles se také jeví jako konzistentní nehledě na metody, kterými byl detekován (De Palma *et al.* 2009; Bonder *et al.* 2016; Quagliariello *et al.* 2016). De Palma et al. ve své studii zmiňují, že by za poklesem četnosti některých rodů včetně rodu *Bifidobacterium* mohl stát snížený příjem polysacharidů na GFD, v naší studii jsme ale žádný významný rozdíl v příjmu polysacharidů mezi skupinami nezaznamenali. Rod *Bifidobacterium* je navíc schopen metabolizovat samotný gluten (Caminero *et al.* 2014), což může hrát v rámci jeho poklesu roli spolu s faktem, že většina prebiotik ve stravě pochází z pšenice a ječmene, tedy plodin, které jsou v rámci GFD ze stravy vyřazeny. Zatímco je rod *Bifidobacterium* obecně vnímán jako zdravý prospěšný, je velmi pravděpodobné, že zvláště ve vztahu k T1D budou mít protektivní účinky pouze některé

druhy či poddruhy, například *Bifidobacterium longum subsp. infantis* (Insel *et al.* 2018), zatímco *Bifidobacterium adolescentis*, které tvořilo většinu u námi pozorovaných změn, těmito vlastnostmi nedisponuje. Zajímavým pozorováním je rovněž pokles v četnosti rodu *Collinsella*. Tento rod bývá označován jako patobiont a bývá zmiňován zejména v souvislosti s diabetem 2. typu (Lambeth *et al.* 2015). Jeho vyšší četnost korelovala s vyššími hladinami inzulinu a vyšší inzulinovou rezistencí (Gomez-Arango *et al.* 2018). Snížený příjem vlákniny ve stravě je asociován s vyšší četností rodu *Collinsella,* mírně vyšší (byť statisticky nesignifikantní) příjem vlákniny v GFD skupině by tak mohl vysvětlit pokles v jeho četnosti. Popisované vyšší množství vlákniny a odolných škrobů v některých GFD produktech (Larretxi *et al.* 2020) by také mohl vysvětlit zvýšení v četnosti rodu *Roseburia* u GFD skupiny. *Roseburia* je v lidském střevě významným producentem butyrátu, mezi jehož účinky patří zlepšení bariérové funkce střeva (Peng *et al.* 2009), zvýšení produkce GLP-1 (Lin *et al.* 2012) a zvýšení citlivosti pro inzulin (Gao *et al.* 2009). Výše popsané změny bakteriálních taxonů by tak mohly částečně vysvětlovat prokázané asociace mezi GFD a klinickým průběhem T1D.

I přes použití dvou metod zvolených k vyšetření střevní propustnosti u pacientů v naší studii jsme nepozorovali výrazný rozdíl mezi GFD a kontrolní skupinou. Absolutní hodnoty sérového zonulinu i exkrečního poměru laktulózy ku mannitolu byly u obou našich skupin vyšší, než bývají popisovány u zdravé populace, nicméně v mezích hodnot, které jsou popisovány u pacientů s T1D (Sapone *et al.* 2006). Nabízí se tedy otázka, zda zvýšená střevní propustnost u pacientů s T1D není spíše důsledkem hyperglykémie než příčinou nebo spolupodílníkem při rozvoji T1D. Design naší studie neumožňuje tuto otázku zodpovědět, nicméně na základě našich výsledků tak můžeme konstatovat, že zavedení GFD není asociováno se změnou střevní propustnosti u dětí s T1D. Korelace, které pozorovány s hodnotou sérového zonulinu, byly pouze slabé a nepředstavují jednotný vzor, ze které by bylo možno vyvodit jednoznačné závěry.

Mezi možnými nositeli vlivu GFD bychom měli vedle střevního mikrobiomu a střevní propustnosti jmenovat také imunitní systém. Zatímco u myších modelů jsou vliv GFD na diabetes a s ním spojené změny v imunologických parametrech dobře popsány (Funda *et al.* 1999, Antvorskov *et al.* 2012), prospektivní studie u lidí dosud chybí.

V patogenezi T1D se na destrukci β-buněk podílí zejména CD4+ a CD8+ T-lymfocyty (Todd *et al.* 2011), nicméně pro rozvoj a progresi onemocnění se jeví podstatná i regulační složka imunitní odpovědi (Sakaguchi *et al.* 2020). Vzhledem k nekonzistentním výsledkům týkajícím se role Foxp3+ T-regulačních lymfocytů jsme se v naší práci rozhodli zaměřit na recentně dobře definovanou, nicméně zejména v lidských studiích málo prozkoumanou skupinu Tr1 buněk. U pacientů s T1D je popisováno menší zastoupení těchto buněk oproti skupině zdravých kontrol (Chujo *et al.* 2015), přičemž nejmenší množství těchto buněk bylo pozorováno ve skupině pacientů, u nichž T1D progredoval nejrychleji (Chujo *et al.* 2020).

Ve zvířecích studiích je adoptivní přenos Tr1 buněk spojen s prevencí diabetu a inhibicí migrace diabetogenních T-lymfocytů do lymfatických uzlin (Chen *et al.* 2003). Zmnožení počtu Tr1 buněk i Foxp3 T-regulačních lymfocytů a dlouhodobá prevence diabetu u NOD myší byla rovněž pozorována po aplikaci kombinační terapie rapamycinem a IL-10 (Battaglia *et al.* 2006). Yu et al. ve své studii navíc demonstrovali, že po podání anti-CD3 protilátky či modifikaci intestinální mikroflóry dojde ke zvýšení počtu Tr1 buněk, zvýšené produkci IL-10 a potlačení proliferace Th1 buněk v pankreatu, což demonstruje klíčovou roli Tr1 v rámci patogeneze diabetu u myší (Yu *et al.* 2017). Kombinační terapie TGF-β spolu s anti-CD3 protilátkou zastavila rozvoj diabetu pravděpodobně na základě potlačení efektorových buněk skrze IL-10 (Mbongue *et al.* 2019).

Tr1 buňky, které mohou být indukovány změnami zevního prostředí například změnou v zastoupení střevních bakterií tak představují nejen nový biomarker progrese diabetu nicméně i potenciální terapeutický cíl. Námi pozorované zvýšené množství Tr1 buněk u pacientů v GFD skupině tak může představovat jeden z mechanismů, které vysvětlují výše popsané pozitivní asociace spojené s dodržováním GFD.

V rámci efektorových buněk jsme ve skupinách nepozorovali rozdíly ve skupinách naivních, centrálních paměťových ani efektorových paměťových buněk. Snížení množství naivních buněk a naopak zvýšené množství centrálních paměťových a efektorových

paměťových buněk bylo pozorováno u pacientů s T1D (Ren *et al.* 2017). Naopak jejich deplece a upravení poměrů mezi regulačními a efektorovými lymfocyty po aplikaci alefaceptu ve studii T1DAL bývá považováno za hlavní mechanismus, kterým dosáhla intervenční skupina vyšší zbytkové kapacity β buněk (Rigby *et al.* 2013; Rigby *et al* 2016).

V naší studii jsme pozorovali nižší množství TEMRA buněk u GFD skupiny oproti kontrolám. Jejich zvýšený počet u pacientů s T1D byl rovněž popsán dvěma kolektivy autorů (Matteuci *et al.* 2011; Akesson *et al.* 2015). Zajímavý je s ohledem na naše výsledky ukazující lepší kompenzaci pacientů na GFD také fakt, že jejich množství pozitivně korelovalo s HbA1c (Matteuci *et al.* 2011). Jedním z možných vysvětlení vyšší proporce TEMRA buněk u pacientů s T1D je chronická antigenní stimulace těchto pacientů (Matteuci *et al.* 2011). Odebráním značně antigenního lepku ze stravy v našem souboru by tak mohlo dojít ke snížené stimulaci a snížení proporce TEMRA buněk.

V poslední části naší práce jsme se zaměřili na možnost snížení incidence diabetu přenesením lidského střevního do bezmikrobních NOD myší. Prokázali jsme, že skupiny myší kolonizované lidskými střevními bakteriemi mají významně nižší incidenci diabetu než myši ponechané bezmikrobní. Rychlost progrese T1D nehrála z hlediska incidence u myších kolonií roli. Rozsah inzulitidy u myších skupin odpovídal těmto zjištěním – byl výrazně vyšší u bezmikrobní skupiny, nicméně mezi jednotlivými dárci se významně nelišil. V četnosti Foxp3+ T-regulačních a IL-10+ T-pomáhajících buněk jsme rozdíly mezi skupinami nepozorovali, což odpovídá předchozím studiím u bezmikrobních zvířat (Alam *et al.* 2011).

Vzhledem k četnosti odběrů k posouzení mikrobiálních změn jsme byli schopni popsat průběh kolonizace myšího střeva lidskými bakteriemi. I přes použití dostatečného množství bakterií a důkladnou inokulaci bylo složení mikrobiomu v myších výrazně rozdílné od složení dárcovského mikrobiomu. Došlo ke značným změnám i ve velmi prevalentních druzích bakterií a některé kmeny (např. Actinobacteria) se v myším střevě nebyly schopné uchytit vůbec. Proces stabilizace převzatého lidského mikrobiomu trval cca 4-5 týdnů, což je výrazně déle, než při převzetí myšího mikrobiomu (El Aidy *et al.*

2016). Jakmile došlo k stabilizaci, finální mikrobiom byl velmi homogenní po celou dobu sledování a výrazně se nelišil mezi myšmi s ohledem na diabetes. Přestože jsme nepozorovali konzistentní změny v mikrobiomu ve vztahu k incidenci diabetu u myších kolonií, pozorovali jsme zajímavé změny u kolonie s nejvyšší incidencí diabetu, kde došlo k poklesu četnosti rodu *Akkermansia,* bakterie, která degraduje mucin a předpokládá se u ní protektivní vliv na střevo (Hanninen *et al.* 2017). U dvou kolonií s nejnižší incidencí pak došlo k téměř úplné eliminaci rodu Bacteroides a jeho nahrazení rody *Alistipes* a *Dysgonomonas*.

11. Závěr

Výsledky prezentované v této práci byly získány zhodnocením dat, která byla získána longitudinálním sledováním dětí s nově diagnostikovaným diabetem 1. typu. Práce se týkala zavedení bezlepkové diety krátce po manifestaci T1D a změn, které s sebou tato dietní změna přináší. Doktorand v rámci svého Ph.D. studia prováděl klinická vyšetření kohorty pacientů a podílel se na laboratorním zpracování získaných vzorků a následné analýze, zhodnocení i statistickém zpracování výsledků projektu.

Zavedení bezlepkové diety po dobu 1 roku krátce po diagnóze diabetu 1. typu u dětí bez céliakie je asociováno s pomalejším úbytkem zbytkové kapacity β-buněk. Dodržování bezlepkové diety bylo po 1 roce asociováno s lepší kompenzací T1D a prodloužením a prohloubením parciální remise onemocnění, nikoli však s celkovou denní dávkou inzulinu a parametry kontinuální monitorace glykémie hodnocené při ukončení studie. Skupina pacientů na bezlepkové dietě se statisticky významně nelišila od kontrolní skupiny v žádném z mikro- ani makronutrientů stravy. Skupiny se statisticky významně nelišily v žádném z aspektů dotazníky zjišťované kvality života.

Před zavedením GFD se střevní mikrobiom intervenční a kontrolní skupiny významně nelišil. Statisticky významné rozdíly se objevily po zavedení GFD – kmen Actinobacteria byl méně četný u intervenční skupiny. Na úrovni rodů byl v intervenční skupině méně četný rod *Bifidobacterium*, naopak rody *Roseburia, Lachnospira* a *Ruminococcacae_UCG-013* byly v GFD skupině četnější. Po zavedení GFD jsme u intervenční skupiny pozorovali významný vzestup rodu *Roseburia* a naopak pokles v četnosti rodů *Collinsella*, *Bifidobacterium, Intestinibacter*, *Romboutsia* a *Terrisporobacter*. Zavedení GFD neovlivnilo žádný z indexů α-diverzity ani statisticky významně nezměnilo poměr Firmicutes ku Bacteroidetes.

Bezlepková dieta nebyla asociována se statisticky významnou změnou střevní propustnosti měřenou koncentrací sérového zonulinu ani exkrečního poměru laktulózy a mannitolu.

U pacientů na GFD jsme po 12 měsících pozorovali statisticky významné změny v některých z populací T-lymfocytů, které jsou popisovány v souvislosti s T1D. Ve skupině na GFD jsme pozorovali oproti kontrolní skupině nižší množství terminálně diferencovaných efektorových paměťových (TEMRA) T-lymfocytů. Naopak u GFD skupiny bylo významně zvýšeno množství IL-10 produkujících T-regulačních lymfocytů typu 1.

Přenos lidského střevního mikrobiomu do bezmikrobních NOD myší vedl ke snížení incidence diabetu u těchto myší. Množství Langerhansových ostrůvků postižených inzulitidou bylo u myší rovněž významně nižší po přenosu mikrobiomu. Rychlost progrese ztráty kapacity β-buněk lidského dárce na bezmikrobní NOD myši střevním mikrobiomem přenositelná není. Po přenosu došlo u myší k selekci určitých druhů bakterií s poklesem α-diverzity. Bakteriální změny byly nespecifické a nejevily žádný obecně vypozorovatelný vzorec ve vztahu k incidenci diabetu v jednotlivých myších koloniích.

12. Souhrn

Nasazením bezlepkové diety krátce po diagnóze T1D u dětí jsme prokázali její asociaci s pomalejším poklesem zbytkové kapacity β buněk, lepší kompenzací a prodloužením obdobím parciální klinické remise. Zároveň jsme v rámci pátrání po patofyziologických mechanismech těchto jevů prokázali, že bezlepková dieta mění složení střevního bakteriomu a četnost některých subtypů T-lymfocytů. Naopak asociace se změnou střevní propustnosti prokázána nebyla.

Zároveň jsme prezentovali, že přenesení lidského střevního mikrobiomu sníží incidenci diabetu u bezmikrobních neobézních diabetických myší. Rychlost progrese ztráty zbytkové funkce β-buněk dárce nicméně nemá vliv na míru snížení incidence. Rovněž jsme prokázali, že myši dokáží lidský mikrobiom převzít pouze částečně a jako model jsou tak nevhodné.

Na základě prezentovaných dat lze uzavřít, že intervence pomocí GFD vede k řadě pozitivních metabolických změn, které mohou přispět k lepší kontrole diabetu v období bezprostředně po manifestaci. Pozorované asociace nicméně ve svém průměru nedosahují významnosti dostačující k formulaci jednoznačnému doporučení stran vhodnosti zahájení GFD u dětí s T1D na populační úrovni. Je možné, že – stejně jako v případě daleko agresivnějších imunomodulačních studií s řadou nežádoucích efektů – je pro dosažení dlouhodobého efektu příliš pozdě a počty reziduálních β-buněk příliš nízké pro to, abychom dosáhli efektů výraznějších. Průkaz vlivu GFD na střevní mikrobiom a imunitní funkce je vhodnou matérií pro cestu k budoucím preventivním studiím zaměřeným na časnější fáze T1D.

13. Summary

Type 1 diabetes mellitus is a chronic autoimmune disease which severely impacts the life of patients and their families. The factors that play a role in its onset and progression remain largely unknown. We administered the gluten-free diet in children shortly after T1D onset and proved its association with slower decrease of the β-cell residual function, better T1D control and prolonged partial clinical remission period. Furthermore, we proved that the gluten-free diet changes the gut microbiome and the abundance of certain subtypes of T-lymphocytes. On the other hand, we did not observe any association of the GFD with intestinal permeability.

We showed that transferring of human gut microbiota into the germ-free non-obese diabetic mice decreases the incidence of diabetes in the colonized mice. The pace of the β-cell function decrease of the donor did not affect the incidence. The transferred microbiota reflected the donor abundance only partially and thus we concluded that mice are not a suitable animal model for similar experiments.

Presented data collectively show profound metabolic changes exerted by GFD that can lead to better control of T1D shortly after its onset. The observed associations nonetheless do not reach the significance needed for recommendation of GFD for T1D children on the population scale. It is possible that the positive changes – observed also in many aggressive immunoregulatory studies with severe side-effects – come too late and affect too few β-cells to have long-lasting effects. Our data, which show positive GFD associations, might thus work as a springboard for future trials that focus earlier stages of T1D.

14. Seznam použité literatury

1. Abdul-Rasoul, M., Habib, H., Al-Khouly, M. (2006) 'The honeymoon phase' in children with type 1 diabetes mellitus: frequency, duration, and influential factors. *Pediatric Diabetes.* 7(2):101-7.
2. Aghili, B., Amirzargar, A. A., Rajab, A. …Massoud, A. (2015) Altered Suppressor Function of Regulatory T Cells in Type 1 Diabetes. *Iranian Journal of Immunology*. 12(4):240-51.
3. Åkesson, K., Tompa, A., Rydén, A., Faresjö, M. (2015) Low expression of CD39(+) /CD45RA(+) on regulatory T cells (Treg) cells in type 1 diabetic children in contrast to high expression of CD101(+) /CD129(+) on Treg cells in children with coeliac disease. *Clinical & Experimental Immunology*. 180(1):70-82.
4. Akerblom, H. K., Knip, M. (1998). Putative environmental factors in Type 1 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 14(1):31-67.
5. Akirav, E., Kushner, J. A., Herold, K. C. (2008). Beta-cell mass and type 1 diabetes: going, going, gone? *Diabetes.* 57(11):2883-8.
6. Alam, C., Bittoun, E., Bhagwat, D. …Hänninen, A. (2011) Effects of a germ-free environment on gut immune regulation and diabetes progression in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetologia*. 54(6):1398-406.
7. American Diabetes Association (2015). Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*.38 Suppl; S8-S16.
8. Anderson, M. S., Bluestone, J. A. (2005) The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annual Reviews in Immunology.* 23:447-85.
9. Antvorskov, J. C., Fundova, P., Buschard, K., Funda, D. P. (2012). Impact of dietary gluten on regulatory T cells and Th17 cells in BALB/c mice. *PLoS One.* 7(3):e33315.
10. Antvorskov, J. C., Fundova, P., Buschard, K., Funda, D. P. (2013). Dietary gluten alters the balance of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in T cells of BALB/c mice. *Immunology.* 138(1):23-33.
11. Antvorskov, J. C., Josefsen, K., Engkilde, K. …Buschard, K. (2014). Dietary gluten and the development of type 1 diabetes. *Diabetologia.* 57(9): 1770-80.
12. Antvorskov, J. C., Halldorsson, T. I., Josefsen, K. …Olsen, S. F. (2018). Association between maternal gluten intake and type 1 diabetes in offspring: national prospective cohort study in Denmark. *British Medical Journal*. 362:k3547.
13. Bach, J. F. (1994) Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocrinology Reviews*. 15(4):516-42.
14. Barnett, A. H., Eff, C., Leslie, R. D., Pyke, D. A. (1981). Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia*. 20(2):87-93.
15. Battaglia, M., Stabilini, A., Draghici, E. …Roncarolo, M. G. (2006) Induction of tolerance in type 1 diabetes via both CD4+CD25+ T regulatory cells and T regulatory type 1 cells. *Diabetes.* 55(6):1571-80.
16. Battelino, T., Danne, T., Bergenstal, R. M. …Phillip, M. (2019). Clinical Targets for Continuous Glucose Monitoring Data Interpretation: Recommendations from the International Consensus on Time in Range. *Diabetes Care.* 42(8):1593-1603.
17. Beilke, J. N., Meagher, C. T., Hosiawa, K. …Lanier, L. L. (2012) NK cells are not required for spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice. *PLoS One.* 7(4):e36011.
18. Beyerlein, A., Chmiel, R., Hummel, S. …Ziegler, A. G. (2014). Timing of gluten introduction and islet autoimmunity in young children: updated results from the BABYDIET study. *Diabetes Care*. 37(9):e194-5.

19. Bluestone, J. A., Tang, Q. (2005) How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Current Opinions on Immunology.* 17(6):638-42.
20. Bonder, M. J., Tigchelaar, E. F., Cai, X. …Zhernakova, A. (2016). The influence of a short-term gluten-free diet on the human gut microbiome. *Genome Medicine.* 8(1):45.
21. Bosi, E., Molteni, L., Radaelli, M. G. …Paroni, R. (2006). Increased intestinal permeability precedes clinical onset of type 1 diabetes. *Diabetologia.* 49(12):2824-7.
22. Bottini, N., Peterson, E. J. (2014) Tyrosine phosphatase PTPN22: multifunctional regulator of immune signaling, development, and disease. *Annual Reviews in Immunology*. 32:83-119.
23. Buckingham, B., Cheng, P., Beck, R. W. …Tamborlane, W, (2015) Diabetes Research in Children Network (DirecNet) and Type 1 Diabetes TrialNet Study Groups. CGM-measured glucose values have a strong correlation with C-peptide, HbA1c and IDAAC, but do poorly in predicting C-peptide levels in the two years following onset of diabetes. *Diabetologia.* 58(6):1167-74.
24. Burrack, A. L., Martinov, T., Fife, B. T. (2017) T Cell-Mediated B Cell Destruction: Autoimmunity and Alloimmunity in the Context of Type 1 Diabetes. Frontiers of Endocrinology 5(8):343.
25. Caminero, A., Herrán, A. R., Nistal, E. …Casqueiro, J. (2014) Diversity of the cultivable human gut microbiome involved in gluten metabolism: isolation of microorganisms with potential interest for coeliac disease. *FEMS Microbiology and Ecology*. 88(2):309-19.
26. Chakir, H., Lefebvre, D. E., Wang, H. …Scott, F. W. (2005). Wheat protein-induced proinflammatory T helper 1 bias in mesenteric lymph nodes of young diabetes-prone rats. *Diabetologia.* 48(8):1576-84.
27. Chen, C., Lee, W. H., Yun, P. …Liu, C. P. (2003) Induction of autoantigen-specific Th2 and Tr1 regulatory T cells and modulation of autoimmune diabetes. *Journal of Immunology*. 171(2):733-44.
28. Chobot, A. Polanska, J., Brandt, A., …Jarosz-Chobot, P. (2017). Updated 24-year trend of Type 1 diabetes incidence in children in Poland reveals a sinusoidal pattern and sustained increase. *Diabetic Medicine.* 34(9):1252-58.
29. Chujo, D., Nguyen, T. S., Foucat, E. …Ueno, H. (2015) Adult-onset type 1 diabetes patients display decreased IGRP-specific Tr1 cells in blood. *Clinical Immunology.* 161(2):270-7.
30. Chujo, D., Kawabe, A., Matsushita, M. …Shimoda, (2020) M. Distinct Phenotypes of Islet Antigen-Specific CD4+ T Cells Among the 3 Subtypes of Type 1 Diabetes. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 105(10):dgaa447.
31. Cinek, O., Kramna, L., Lin, J., et al (2017) Imbalance of bacteriome profiles within the Finnish Diabetes Prediction and Prevention study: parallel use of 16S profiling and virome sequencing in stool samples from children with islet autoimmunity and matched controls. *Pediatric Diabetes*. 18: 588-598.
32. Coleman, D. L., Kuzava, J. E., Leiter, E. H. (1990). Effect of diet on incidence of diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes.* 39(4):432-6.
33. Collin, P., Kaukinen, K., Valimaki, M., Salmi, J. (2002). Endocrinological disorders and celiac disease. *Endocrine Reviews.* 23(4):464-83.
34. Comino, I., Fernandez-Banares, F., Esteve, M., et al. (2016) Fecal Gluten Peptides Reveal Limitations of Serological Tests and Food Questionnaires for Monitoring Gluten-Free Diet in Celiac Disease Patients. *American Journal of Gastroenterology.* 111(10):1456-1465.

35. Cosnes, J., Cellier, C., Viola, S. …Nion-Larmurier, I. (2008). Incidence of autoimmune diseases in celiac disease: protective effect of the gluten-free diet. *Clinical Gastroenterology and Hepatology.* 6(7):753-8.
36. Craig, M. E., Prinz, N., Boyle, C. T. …Warner, J. T. (2017). Prevalence of Celiac Disease in 52,721 Youth with Type 1 Diabetes: International Comparison Across Three Continents. *Diabetes Care. 40*(8): 1034-1040.
37. Dall, M., Calloe, K., Haupt-Jorgensen, M. …Buschard, K. (2013). Gliadin fragments and a specific gliadin 33-mer peptide close KATP channels and induce insulin secretion in INS-1E cells and rat islets of Langerhans. *PLoS One.* 8(6):e66474.
38. David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N. …Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 505(7484):559-63.
39. Davis, A. K., DuBose, S. N., Haller, M. J. …Greenbaum, C. J. (2015). Prevalence of detectable C-Peptide according to age at diagnosis and duration of type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 38(3):476-81.
40. Davis-Richardson, A. G., Ardissone, A. N., Dias, R. …Triplett, E. W. (2014). Bacteroides dorei dominates gut microbiome prior to autoimmunity in Finnish children at high risk for type 1 diabetes. *Frontiers of Microbiology*. 5:678.
41. De Palma, G., Nadal, I., Collado, M. C., Sanz, Y. (2009) Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *British Journal of Nutrition.* 102(8):1154-60.
42. DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., Oram, R. A. (2018) Type 1 diabetes. *Lancet.* 391(10138):2449-2462.
43. DiMeglio, L. A., Acerini, C. L., Codner, E. …Maahs, D. M. (2018). ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Glycemic control targets and glucose monitoring for children, adolescents, and young adults with diabetes. *Pediatric Diabetes.* 19 Suppl 27:105-114.
44. El Aidy, S., van Baarlen, P., Derrien, M. …Kleerebezem, M. (2012) Temporal and spatial interplay of microbiota and intestinal mucosa drive establishment of immune homeostasis in conventionalized mice. *Mucosal Immunology.* 5(5):567-79.
45. El Asmar, R., Panigrahi, P., Bamford, P. …Fasano, A. (2002). Host-dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure. *Gastroenterology*. 123(5):1607-15.
46. El Essawy, B., Li, X. C. (2015) Type 1 diabetes and T regulatory cells. *Pharmacology Research.* 98:22-30.
47. Ellis, J. S., Wan, X., Braley-Mullen, H. (2013) Transient depletion of CD4+ CD25+ regulatory T cells results in multiple autoimmune diseases in wild-type and B-cell-deficient NOD mice. *Immunology.* 139(2):179-86.
48. Endesfelder, D., Zu Castell, W., Bonifacio, E., …Achenbach, P. (2019). Time-Resolved Autoantibody Profiling Facilitates Stratification of Preclinical Type 1 Diabetes in Children. *Diabetes.* 68(1):119-130.
49. Erlich, H., Valdes, A. M., Noble, J. …Moonsamy, P. (2008) Type 1 Diabetes Genetics Consortium. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes.* 57(4):1084-
50. Farrokhyar, F., Swarbrick, E. T., Irvine, E. J. (2001). A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology.* 36(1):2-15.
51. Fasano, A., Not, T., Wang, W. …Goldblum, S. E. (2000). Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet.* 355(9214):1518-9.

52. Flohe, S. B., Wasmuth, H. E., Kerad, J. B. …Kolb, H. (2003). A wheat-based, diabetes-promoting diet induces a Th1-type cytokine bias in the gut of NOD mice. *Cytokine.* 21(3):149-54.
53. Fuchtenbusch, M., Ziegler, A. G., Hummel, M. (2004). Elimination of dietary gluten and development of type 1 diabetes in high risk subjects. *The Review of Diabetic Studies.* 1(1):39-41.
54. Funda, D. P., Kaas, A., Bock, T. …Buschard, K. (1999). Gluten-free diet prevents diabetes in NOD mice. *Diabetes/Metabolism Research Reviews*. 15(5):323-7.
55. Funda, D. P., Kaas, A., Tlaskalova-Hogenova, H., Buschard, K. (2008). Gluten-free but also gluten-enriched (gluten+) diet prevent diabetes in NOD mice; the gluten enigma in type 1 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research Reviews*. 24(1):59-63.
56. Galipeau, H. J., Rulli, N. E., Jury, J. …Verdu, E. F. (2011) Sensitization to gliadin induces moderate enteropathy and insulitis in nonobese diabetic-DQ8 mice. *Journal of Immunology*. 187(8):4338-46.
57. Gao, Z., Yin, J., Zhang, J. …Ye, J. (2009) Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes.* 58(7):1509-17.
58. Garcia-Lafuente, A., Antolin, M., Guarner, F. …Malagelada, J. R. (2001). Modulation of colonic barrier function by the composition of the commensal flora in the rat. *Gut.* 48(4):503-7.
59. Ghonaim, M. M., El-Edel, R. H., Kamal Eldein, S. M. …Salman, S. S. (2017) T-Regulatory Cell Subsets in Children with Type 1 Diabetes Mellitus: Relation to Control of the Disease. *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders - Drug Targets*. 17(3):238-245.
60. Gomez-Arango, L. F., Barrett, H. L., Wilkinson, S. A. …Dekker Nitert, M. (2018) Low dietary fiber intake increases Collinsella abundance in the gut microbiota of overweight and obese pregnant women. *Gut Microbes*. 9(3):189-201.
61. Graham, K. L., Krishnamurthy, B., Fynch, S. …Thomas, H. E. (2011) Autoreactive cytotoxic T lymphocytes acquire higher expression of cytotoxic effector markers in the islets of NOD mice after priming in pancreatic lymph nodes. *American Journal of Pathology*. 178(6):2716-25.
62. Greenbaum, C. J., Mandrup-Poulsen, T., McGee, P. F. (2008) Mixed-meal tolerance test versus glucagon stimulation test for the assessment of β-cell function in therapeutic trials in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 31(10):1966-1971.
63. Gur, C., Porgador, A., Elboim, M. …Mandelboim, O. (2010) The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nature Immunology*. 11(2):121-8.
64. Hamilton, M. J., Weingarden, A. R., Sadowsky, M.J. …Khoruts, A. (2012) Standardized frozen preparation for transplantation of fecal microbiota for recurrent *Clostridium difficile* infection. *American Journal of Gastroenterology*. 107: 761-767.
65. Hanninen, A., Toivonen, R., Poysti, S. …De Vos, W. M. (2018). Akkermansia muciniphila induces gut microbiota remodelling and controls islet autoimmunity in NOD mice. *Gut.* 67(8):1445-1453.
66. Hansen, A. K., Ling, F., Kaas, A. …Buschard, K. (2006). Diabetes preventive gluten-free diet decreases the number of caecal bacteria in non-obese diabetic mice. *Diabetes/Metabolism Research Reviews*. 22(3):220-5.
67. Hansen, C. H., Krych, L., Buschard, K. …Hansen, A. K. (2014). A maternal gluten-free diet reduces inflammation and diabetes incidence in the offspring of NOD mice. *Diabetes.* 63(8):2821-32.
68. Harbison, J. E., Roth-Schulze, A. J., Giles, L. C. …Couper, J. J. (2019). Gut microbiome dysbiosis and increased intestinal permeability in children with islet

autoimmunity and type 1 diabetes: A prospective cohort study. *Pediatric Diabetes*. 20(5):574-583.
69. Haseda, F., Imagawa, A., Murase-Mishiba, Y. …Hanafusa, T. (2013) $CD4^+$ $CD45RA^-$ FoxP3high activated regulatory T cells are functionally impaired and related to residual insulin-secreting capacity in patients with type 1 diabetes. *Clinical and Experimental Immunology.* 173(2):207-16.
70. Herold, K. C., Bundy, B. N., Long, S. A. …Greenbaum, C. J. (2019). An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in Relatives at Risk for Type 1 Diabetes. *New England Journal of Medicine.* 381(7):603-613.
71. Hooper, L. V., Littman, D. R., Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science.* 336(6086):1268-73.
72. Hoorfar, J., Buschard, K., Dagnaes-Hansen, F. (1993) Prophylactic nutritional modification of the incidence of diabetes in autoimmune non-obese diabetic (NOD) mice. *British Journal of Nutrition.* 69:597-607
73. Hummel, S., Pfluger, M., Hummel, M. …Ziegler, A. G. (2011). Primary dietary intervention study to reduce the risk of islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes: the BABYDIET study. *Diabetes Care.* 34(6):1301-5.
74. Hyoty, H. (2016). Viruses in type 1 diabetes. *Pediatric Diabetes*. 17 Suppl 22:56-64.
75. Hyoty, H., Leon, F., Knip, M. (2018). Developing a vaccine for type 1 diabetes by targeting coxsackievirus B. *Expert Review of Vaccines*. 17(12):1071-1083.
76. Insel, R., Dunne, J. L., Atkinson, M. A. …Ziegler, A. G. (2015). Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 38(10):1964-74.
77. Insel, R., Knip, M. (2018). Prospects for primary prevention of type 1 diabetes by restoring a disappearing microbe. *Pediatric Diabetes.* 19(8):1400-1406.
78. Jelínková, L., Tucková, L., Cinová, J. …Tlaskalová-Hogenová H. (2004). Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF-alpha through a mechanism involving NF-kappaB. *FEBS Letters*. 571(1-3):81-5.
79. Karvonen, M., Viik-Kajander, M., Moltchanova, E., …Tuomilehto, J. (2000). Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care*. 23(10): 1516-26.
80. Kemppainen, K. M., Ardissone, A. N., Davis-Richardson, A. G. …Triplett, E. W. (2015). Early childhood gut microbiomes show strong geographic differences among subjects at high risk for type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 38(2):329-32.
81. Knip, M., Korhonen, S., Kulmala, P. …Akerblom, H. K. (2010). Prediction of type 1 diabetes in the general population. *Diabetes Care*. 33(6):1206-12.
82. Knip, M. (2011). Pathogenesis of type 1 diabetes: implications for incidence trends. *Hormone Research in Paediatrics.* 76 Suppl 1: 57-64.
83. Knip, M., Honkanen, J. (2017). Modulation of Type 1 Diabetes Risk by the Intestinal Microbiome. *Current Diabetes Reports*. 17(11):105.
84. Knip, M., Akerblom, H. K., Al Taji, E. …Wasikowa, R. (2018). Effect of Hydrolyzed Infant Formula vs Conventional Formula on Risk of Type 1 Diabetes: The TRIGR Randomized Clinical Trial. *The Journal of American Medical Association.* 319(1):38-48.
85. Kondrashova, A., Reunanen, A., Romanov, A. …Hyoty, H. (2005). A six-fold gradient in the incidence of type 1 diabetes at the eastern border of Finland. *Annals of Medicine*. 37(1):67-72.
86. Kostic, A. D., Gevers, D., Siljander, H. …Xavier, R. J. (2015). The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. *Cell Host & Microbe*. 17(2):260-73.

87. Köttgen, E., Kluge, F., Volk, B., Gerok, W. (1983) The lectin properties of gluten as the basis of the pathomechanism of gluten-sensitive enteropathy. *Klinische Wochenschrift.* 61(2):111-2.
88. Krischer, J. P., Liu, X., Vehik, K. …Lernmark, A. (2019). Predicting Islet Cell Autoimmunity and Type 1 Diabetes: An 8-Year TEDDY Study Progress Report. *Diabetes Care*. 42(6):1051-1060.
89. Krogvold, L., Edwin, B., Buanes, T. …Dahl-Jorgensen, K. (2015). Detection of a low-grade enteroviral infection in the islets of Langerhans of living patients newly diagnosed with type 1 diabetes. *Diabetes.* 64(5):1682-7.
90. Lachin, J. M., McGee, P., Palmer, J. P. (2014). Impact of C-peptide preservation on metabolic and clinical outcomes in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes.* 63(2):739-48.
91. Lambeth, S. M., Carson, T., Lowe, J. …Shah, V. O. (2015) Composition, Diversity and Abundance of Gut Microbiome in Prediabetes and Type 2 Diabetes. *Journal of Diabetes and Obesity.* 2(3):1-7.
92. Lammers, K. M., Lu, R., Brownley, J. …Fasano, A. (2008). Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology.* 135(1):194-204 e3.
93. Larsen, J., Weile, C., Antvorskov, J. C. …Buschard, K. (2015). Effect of dietary gluten on dendritic cells and innate immune subsets in BALB/c and NOD mice. *PLoS One.* 10(3):e0118618.
94. Larretxi, I., Churruca, I., Navarro, V. …Simon, E. (2020) Effect of analytically measured fiber and resistant starch from gluten-free products on the diets of individuals with celiac disease. *Nutrition*. 70:110586.
95. Li, Y., Liu, Y., Chu, C. Q. (2015) Th17 Cells in Type 1 Diabetes: Role in the Pathogenesis and Regulation by Gut Microbiome. *Mediators of Inflammation.* doi: 10.1155/2015/638470. Epub 2015 Dec 30.
96. Lin, H. V., Frassetto, A., Kowalik, E. J. Jr. …Marsh, D. J. (2012). Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanisms. *PLoS One*. 7(4):e35240.
97. Ludvigsson, J., Carlsson, A., Deli, A. …Samuelsson, U. (2013). Decline of C-peptide during the first year after diagnosis of Type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 100(2):203-9.
98. Ludvigsson, J., Wahlberg, J., Casas, R. (2017) Intralymphatic Injection of Autoantigen in Type 1 Diabetes. *New England Journal of Medicine.* 16;376(7):697-699.
99. Luppi, P., Cifarelli, V., Wahren, J. (2011). C-peptide and long-term complications of diabetes. *Pediatric Diabetes.* 12(3 Pt 2):276-92.
100. Maahs, D. M., West, N. A., Lawrence, J. M., Mayer-Davis, E. J. (2010). Epidemiology of Type 1 Diabetes. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America* 39(3):481-97.
101. Madsbad, S., Alberti, K. G., Binder, C. …Regeur, L. (1979). Role of residual insulin secretion in protecting against ketoacidosis in insulin-dependent diabetes. *British Medical Journal.* 2(6200):1257-9.
102. Makinen, M., Mykkanen, J., Koskinen, M. …Toppari, J. (2016). Serum 25-Hydroxyvitamin D Concentrations in Children Progressing to Autoimmunity and Clinical Type 1 Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 101(2):723-9.
103. Marietta, E. V., Gomez, A. M., Yeoman, C. …Rajagopalan, G. (2013). Low incidence of spontaneous type 1 diabetes in non-obese diabetic mice raised on gluten-

free diets is associated with changes in the intestinal microbiome. *PLoS One*. 8(11):e78687.
104. Matsuzaki, T., Nagata, Y., Kado, S. …Yokokura, T. (1997). Prevention of onset in an insulin-dependent diabetes mellitus model, NOD mice, by oral feeding of Lactobacillus casei. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica.* 105(8):643-9.
105. Matteucci, E., Ghimenti, M., Di Beo, S., Giampietro, O. (2011) Altered proportions of naïve, central memory and terminally differentiated central memory subsets among CD4+ and CD8 + T cells expressing CD26 in patients with type 1 diabetes. *Journal of Clinical Immunology*. 31(6):977-84.
106. Mbongue, J. C., Rawson. J., Garcia, P. A. …Husseiny, M. I. (2019) Reversal of New Onset Type 1 Diabetes by Oral Salmonella-Based Combination Therapy and Mediated by Regulatory T-Cells in NOD Mice. *Frontiers of Immunology*. 26;10:320.
107. Mortensen, H. B., Hougaard, P., Swift, P., et al. (2009) New definition for the partial remission period in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 32(8):1384-1390.
108. Mortensen, H. B., Swift, P. G., Holl, R. W. …Knip, M. (2010). Multinational study in children and adolescents with newly diagnosed type 1 diabetes: association of age, ketoacidosis, HLA status, and autoantibodies on residual β-cell function and glycemic control 12 months after diagnosis. *Pediatric Diabetes*. 11(4):218-26.
109. Nagl, K., Hermann, J. M., Plamper. M. …Holl, R. W. (2017) Factors contributing to partial remission in type 1 diabetes: analysis based on the insulin dose-adjusted HbA1c in 3657 children and adolescents from Germany and Austria. *Pediatric Diabetes*. 18(6):428-434.
110. Nistal, E., Caminero, A., Herran, A. R. …Casqueiro, J. (2012). Differences of small intestinal bacteria populations in adults and children with/without celiac disease: effect of age, gluten diet, and disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 18(4):649-56.
111. Noble, J. A., (2015) Immunogenetics of type 1 diabetes: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*. 64:101-12.
112. Norris, J. M., Barriga, K., Klingensmith, G. …Rewers, M. (2003). Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *Journal of the American Medical Association.* 290(13):1713-20.
113. Odegard, J. M., Nepom, G. T., Wambre, E. (2015) Biomarkers for antigen immunotherapy in allergy and type 1 diabetes. *Clinical Immunology*. 161(1):44-50.
114. Orban, T., Bundy, B., Becker, D. J. …Skyler, J. S. (2011) Type 1 Diabetes TrialNet Abatacept Study Group. Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 30;378(9789):412-9.
115. Palova-Jelinkova, L., Rozkova, D., Pecharova, B. …Tuckova, L. (2005). Gliadin fragments induce phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. *Journal of Immunology.* 175(10):7038-45.
116. Palová-Jelínková, L., Dáňová, K., Drašarová, H. …Tučková, L. (2013). Pepsin digest of wheat gliadin fraction increases production of IL-1β via TLR4/MyD88/TRIF/MAPK/NF-κB signaling pathway and an NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One*. 8(4):e62426.
117. Parackova, Z., Kayserova, J., Danova, K. …Sediva, A. (2016) T regulatory lymphocytes in type 1 diabetes: Impaired CD25 expression and IL-2 induced STAT5 phosphorylation in pediatric patients. *Autoimmunity*, 49(8):523-531.
118. Pastore, M. R., Bazzigaluppi, E., Belloni, C. …Bosi, E. (2003). Six months of gluten-free diet do not influence autoantibody titers, but improve insulin secretion in

subjects at high risk for type 1 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 88(1):162-5.
119. Patterson, C. C., Dahlquist, G. G., Gyurus, E. …Soltesz, G. (2009). Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet.* 373(9680): 2027-33.
120. Patterson, C. C., Harjutsalo, V., Rosenbauer, J., …Green, A. (2019). Trends and cyclical variation in the incidence of childhood type 1 diabetes in 26 European centres in the 25 year period 1989-2013: a multicentre prospective registration study. *Diabetologia*, 62(3);408-417.
121. Peng, L., Li, Z. R., Green, R. S. …Lin, J. (2009). Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *Journal of Nutrition*. 139(9):1619-25.
122. Piper, J. L., Gray, G. M., Khosla, C (2004). Effect of prolyl endopeptidase on digestive-resistant gliadin peptides in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 311(1):213-9.
123. Pozzilli, P., Signore, A., Williams, A. J., Beales, P. E. (1993). NOD mouse colonies around the world-recent facts and figures. *Immunology Today*. 14(5):193-6.
124. Qin, J., Li, R., Raes, J. …Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 464(7285):59-65.
125. Quagliariello, A., Aloisio, I., Bozzi Cionci, N. …Di Gioia, D. (2016) Effect of Bifidobacterium breve on the Intestinal Microbiota of Coeliac Children on a Gluten Free Diet: A Pilot Study. *Nutrients.* 8(10):660.
126. Quercia, S., Candela, M., Giuliani, C. …Pirazzini, C. (2014). From lifetime to evolution: timescales of human gut microbiota adaptation. *Frontiers of Microbiology*. 5:587.
127. Raab, J., Giannopoulou, E. Z., Schneider, S. …Ziegler, A. G. (2014). Prevalence of vitamin D deficiency in pre-type 1 diabetes and its association with disease progression. *Diabetologia.* 57(5):902-8.
128. Raab, J., Haupt, F., Scholz, M. …Ziegler, A. G. (2016). Capillary blood islet autoantibody screening for identifying pre-type 1 diabetes in the general population: design and initial results of the Fr1da study. *British Medical Journal Open*. 6(5):e011144.
129. Redondo, M. J., Oram, R. A., Steck, A. K. (2017). Genetic Risk Scores for Type 1 Diabetes Prediction and Diagnosis. *Current Diabetes Reports*. 17(12):129.
130. Ren, X., Mou, W., Su, C. …Gong, C. (2017) Increase in Peripheral Blood Intermediate Monocytes is Associated with the Development of Recent-Onset Type 1 Diabetes Mellitus in Children. *International Journal Biological Sciences.* 5(2):209-218.
131. Rigby, M. R., DiMeglio, L. A., Rendell, M. S. …Ehlers, M. R. (2013) T1DAL Study Team. Targeting of memory T cells with alefacept in new-onset type 1 diabetes (T1DAL study): 12 month results of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Diabetes and Endocrinology*. 1(4):284-94.
132. Rigby, M. R., Harris, K. M., Pinckney, A. …Ehlers, M. R. (2015) Alefacept provides sustained clinical and immunological effects in new-onset type 1 diabetes patients. *Journal of Clinical Investigations*. 125(8):3285-96.
133. Rose, N. R., Bona, C. (1993) Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunology Today*. 14(9):426-30.
134. Sakaguchi, S., Mikami, N., Wing, J. B. …Ohkura, N. (2020) Regulatory T Cells and Human Disease. *Annual Reviews of Immunology*. 26(38)541-566.

135. Sapone, A., de Magistris, L., Pietzak, M. …Fasano, A. (2006). Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes.* 55(5):1443-9.
136. Scott, F. W. (1996). Food-induced type 1 diabetes in the BB rat. *Diabetes/Metabolism Reviews.* 12(4):341-59.
137. Sequeira, I. R., Lentle, R. G., Kruger, M. C., Hurst, R. D. (2014) Standardising the lactulose mannitol test of gut permeability to minimise error and promote comparability. *PLoS One*. 9(6):e99256.
138. Shewry, P. R., Halford, N. G., Belton, P. S., Tatham, A. S. (2002). The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 357(1418):133-42.
139. Shin, N. R., Lee, J. C., Lee, H. Y. …Bae, J. W. (2014). An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut.* 63(5):727-35.
140. Sildorf, S. M., Fredheim, S., Svensson, J., Buschard, K. (2012). Remission without insulin therapy on gluten-free diet in a 6-year old boy with type 1 diabetes mellitus. *British Medical Journal Case Reports.* 2012.
141. Sommer, F., Backhed, F. (2013). The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*. 11(4):227-38.
142. Sorensen, J. S., Johannesen, J., Pociot, F. …Birkebaek, N. H. (2013). Residual β-Cell function 3-6 years after onset of type 1 diabetes reduces risk of severe hypoglycemia in children and adolescents. *Diabetes Care.* 36(11):3454-9.
143. Sorkio, S., Cuthbertson, D., Barlund, S. …Virtanen, S. M. (2010). Breastfeeding patterns of mothers with type 1 diabetes: results from an infant feeding trial. *Diabetes/Metabolism Research Reviews.* 26(3):206-11.
144. Steffes, M. W., Sibley, S., Jackson, M., Thomas, W. (2003). B-cell function and the development of diabetes-related complications in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care.* 26(3):832-6.
145. Stewart, C. J., Ajami, N. J., O'Brien, J. L. …Petrosino, J. F. (2018) Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature*. 562(7728):583-588.
146. Sumnik, Z., Kolouskova, S., Malcova, H. …Cinek, O. (2005). High prevalence of coeliac disease in siblings of children with type 1 diabetes. *European Journal of Pediatrics.* 164(1):9-12.
147. Šumník, Z., Venháčová, J., Škvor, J. …Cinek O (2020). Five years of improving diabetes control in Czech children after the establishment of the population-based childhood diabetes register ČENDA. *Pediatric Diabetes*. 21(1):77-87.
148. Svensson, J., Sildorf, S. M., Pipper, C. B. …Buschard, K. (2016). Potential beneficial effects of a gluten-free diet in newly diagnosed children with type 1 diabetes: a pilot study. *Springerplus.* 5(1):994.
149. Takiishi, T., Fenero, C. I. M., Camara, N. O. S. (2017). Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers*. 5(4):e1373208.
150. Tapia, G., Cinek, O., Rasmussen, T. …Rønningen, K. S. (2011) Human enterovirus RNA in monthly fecal samples and islet autoimmunity in Norwegian children with high genetic risk for type 1 diabetes: the MIDIA study. *Diabetes Care.* 34(1):151-5.
151. Tauriainen, S., Martiskainen, M., Oikarinen, S. …Hyöty, H. (2007) Human parechovirus 1 infections in young children--no association with type 1 diabetes. *Journal of Medical Virology.* 79(4):457-62.

152. Todd, J. A., Knip, M., Mathieu, C. (2011) Strategies for the prevention of autoimmune type 1 diabetes. *Diabetic Medicine.* 28(10):1141-3.
153. Upton, M. N., McConnachie, A., McSharry, C., …Watt, G. C. (2000). Intergenerational 20 year trends in the prevalence of asthma and hay fever in adults: the Midspan family study surveys of parents and offspring. *British Medical Journal*. 321(7253):88-92.
154. Uusitalo, U., Lee, H. S., Andren Aronsson, C. …Norris, J. M. (2018). Early Infant Diet and Islet Autoimmunity in the TEDDY Study. *Diabetes Care*. 41(3):522-530.
155. Varni, J. W., Delamater, A. M., Hood, K. K., et al. (2018) PedsQL 3.2 Diabetes Module for Children, Adolescents, and Young Adults: Reliability and Validity in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care.* 41(10):2064-2071.
156. Vatanen, T., Kostic, A. D., d'Hennezel, E. …Xavier, R. J. (2016). Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans. *Cell.* 165(6):1551.
157. Vatanen, T., Franzosa, E. A., Schwager, R. …Xavier, R. J. (2018). The human gut microbiome in early-onset type 1 diabetes from the TEDDY study. *Nature.* 562(7728):589-594.
158. Visser, J. T., Lammers, K., Hoogendijk, A. …Rozing, J. (2010). Restoration of impaired intestinal barrier function by the hydrolysed casein diet contributes to the prevention of type 1 diabetes in the diabetes-prone BioBreeding rat. *Diabetologia.* 53(12):2621-8.
159. von Hertzen, L., Beutler, B., Bienenstock, J. …de Vos, W. M. (2015). Helsinki alert of biodiversity and health. *Annals of Medicine*. 47(3):218-25.
160. Wang, J., Liu, L., Ma, J. …Gu, M. (2014) Common variants on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 polymorphisms contributes to type 1 diabetes susceptibility: evidence based on 58 studies. *PLoS One*. 23;9(1):e85982.
161. Watts, T., Berti, I., Sapone, A. …Fasano, A. (2005). Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type I diabetes in BB diabetic-prone rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 102(8):2916-21.
162. You, S., Alyanakian, M. A., Segovia, B. …Chatenoud, L. (2008) Immunoregulatory pathways controlling progression of autoimmunity in NOD mice. *Annals of New York Academy of Sciences*. 1150:300-10.
163. Yu, H., Gagliani, N., Ishigame, H. …Flavell, R. A. (2017) Intestinal type 1 regulatory T cells migrate to periphery to suppress diabetogenic T cells and prevent diabetes development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 114(39):10443-10448.
164. Ziegler, A. G., Schmid, S., Huber, D. …Bonifacio, E. (2003). Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *Journal of the American Medical Association*. 290(13):1721-8.
165. Ziegler, A. G., Rewers, M., Simell, O., et al. (2013) Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *Journal of American Medical Association.* 309(23):2473-2479.

15. Příloha č. 1 – Seznam publikací autora

Původní vědecké práce in extenso, které jsou podkladem disertace

S impact factorem, 1. kvartil publikací v oboru Endokrinologie, diabetologie a metabolismus

Neuman V, Cinek O, Funda DP, Hudcovic T, Golias J, Kramna L, Petruzelkova L, Pruhova S, Sumnik Z. Human gut microbiota transferred to germ-free NOD mice modulate the progression towards type 1 diabetes regardless of the pace of beta cell function loss in the donor. *Diabetologia*. 2019 Jul;62(7):1291-1296. **(IF 7.518)**

Neuman V, Pruhova S, Kulich M, Kolouskova S, Vosahlo J, Romanova M, Petruzelkova L, Obermannova B, Funda DP, Cinek O, Sumnik Z. Gluten-free diet in children with recent-onset type 1 diabetes: A 12-month intervention trial. *Diabetes, Obesity & Metabolism* 2020 May;22(5):866-872. **(IF 5.900)**

Původní vědecké práce in extenso s částečným vztahem k tématu dizertace nebo bez vztahu k tématu dizertace

S impact factorem

Petruzelkova L, Soupal J, Plasova V, Jiranova P, Neuman V, Plachy L, Pruhova S, Sumnik Z, Obermannova B. Excellent Glycemic Control Maintained by Open-Source Hybrid Closed-Loop AndroidAPS During and After Sustained Physical Activity. *Diabetes Technology & Therapeutics* 2018. 20(11), 744-750 **(IF=2.921)**

Plachy L, Elblova L, Neuman V, Fencl F, Blahova K, Stranak Z, Lebl J, Pruhova S. For debate: The significance of etiologic diagnosis in neonates with overgrowth syndromes. Lessons learned from Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Pediatric Endocrinology Reviews*. 2018. 16(1), 171-177 **(IF=0.6)**

Petruzelkova L, Jiranova P, Soupal J, Kozak M, Plachy L, Neuman V, Pruhova S, Obermannova B, Kolouskova S, Sumnik Z. Pre-school and school-aged children benefit from a switch from a sensor-augmented pump to an AndroidAPS hybrid closed-loop: A retrospective analysis. *Pediatric Diabetes*. 2021 **(IF 4.267)**