Univerzita Karlova
2. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce

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

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

Vít Neuman

Praha, 2021

Disertační práce byla vypracována v rámci *prezenčního* studia doktorského studijního programu Fyziologie a patofyziologie člověka *na Pediatrické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy*

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

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady *Fyziologie a patofyziologie člověka* dne ..... v ..... od .....
hod. Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:
Prof. MUDr. Otomar Kittnar, MBA, CSc.
Fyziologický ústav 1. LF UK

Děkan fakulty: *prof. MUDr. Vladimír Komárek, CSc.*

Tato práce vznikla za podpory grantu
AZV – číslo grantu 16-27994A

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06, Praha 5 (tel. 224 435 836)

Obsah

Obsah 3
Abstrakt 4
Abstract 5
1. Úvod 6
2. Hypotézy a cíle práce 9
2.1. Hypotéza 9
2.2. Cíle vědecké práce 9
3. Materiál a metodika 10
3.1. Postup řešení postgraduálního studia 10
4. Výsledky 11
5. Diskuze 14
6. Závěry 17
7. Conclusions 18
8. Použitá literatura 19
CURRICULUM VITAE. 22
Přehled publikační aktivity autora 24

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.

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.

1. Úvod

Diabetes 1. typu (T1D) je multifaktoriální onemocnění charakterizované absolutním nedostatkem inzulinu v důsledku destrukce beta-buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu autoimunitním procesem. Na vzniku a progresi onemocnění se podílejí genetické a environmentální faktory. Zatímco genetické faktory jsou poměrně dobře popsány, o vlivech vnějšího prostředí na T1D máme zatím jen velmi omezené znalosti.

Jedním z faktorů, jež mohou hrát roli v rozvoji či dalším průběhu T1D by mohl být **lepek,** což je kolektivní název pro glutenin a gliadin, proteiny pšenice, ječmene a žita. O lepku je známo, že může být antigenním stimulátorem imunity (Piper *et al.* 2004). Souvislost mezi lepkem a patogenezí T1D naznačují například studie na myších modelech, u nichž dochází při krmení bezlepkovou stravou (GFD) k redukci incidence z 64 na 15 % (Funda *et al.* 1999). U lidí jsou důkazy o vlivu lepku méně jednoznačné a nepřímé. V rámci rozvoje ostrůvkové autoimunity bylo zkoumáno zejména **načasování zařazení lepku do stravy kojence**. Velké mezinárodní studie TEDDY (Uusitalo *et al.* 2018), BABYDIET (Ziegler *et al.* 2003) a DAISY (Norris *et al.* 2003) jednotlivě identifikovaly zvýšené riziko rozvoje autoimunity, nicméně ohledně načasování introdukce lepku nedošly ke shodě. V případě již stanovené autoimunity bezlepková dieta nevede k oddálení manifestace T1D ani k redukci v titru protilátek (Fuchtenbusch *et al.* 2004; Pastore *et al.* 2003). Zajímavá data jsou k dispozici ohledně vlivu bezlepkové diety u pacientů s již diagnostikovaným T1D – jedná se jednak o kazuistická sdělení pacientů, kteří byli na GFD schopni na delší dobu vysadit inzulinoterapii (Sildorf *et al.* 2012) a následně i intervenční studii, v níž byli pacienti **na GFD lépe kompenzovaní a měli prodloužené období klinické remise** oproti historickým kontrolám (Svensson *et al.* 2016).

Dalším z možných environmentálních faktorů s vlivem na T1D je **střevní mikrobiom**. Je zřejmé, že změny v životním stylu posledních několika dekád výrazně mění jeho složení (von Hertzen *et al.* 2015) a vzhledem k jeho roli v navozování imunotolerance by mohly souviset i s autoimunitami včetně T1D (Hooper *et al.* 2012). U neobézních diabetických (NOD) myší je **bezmikrobní prostředí asociováno se zvýšeným výskytem diabetu** (Pozzilli *et al.* 1993) a naopak podání usmrcených mikrobů vede ke snížení jeho incidence (Matsuzaki *et al.* 1997). U lidí je situace o poznání komplexnější a přes počáteční náznaky zvýšené četnosti některých bakteriálních druhů u pacientů, kteří rozvinuli T1D (Davis-Richardson *et al.* 2014), nebyly tyto

výsledky dále potvrzeny. V posledních letech nevnesla více světla do tohoto problému ani velká multicentrická studie TEDDY, jež na globální úrovni žádné rozdíly mezi pacienty, kteří rozvinuli T1D a kteří zůstali zdraví, nenašla (Vatanen *et al.* 2018). Kromě toho je možné, že roli hrají také bakterie, jež mají z hlediska rozvoje diabetu protektivní vliv. V této souvislosti se mluví zejména o *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis* (Insel *et al.* 2018) a *Akkermansia muciniphila* (Hanninen *et al.* 2018). **Bezlepková dieta je známým modifikátorem složení střevní mikroflóry** (Bonder *et al.* 2016) a je tak možné, že by její případné efekty na T1D mohly být vysvětlitelné právě změnou složení mirkobiomu ve prospěch bakterií s protektivními vlastnosti.

Důležitá by z hlediska patogeneze a progrese diabetu mohla být také **střevní propustnost**. Její zvýšení bylo pozorováno nejen u lidí s T1D (Fasano *et al.* 2000), ale také u osob, u kterých je patrná ostrůvková autoimunita, nicméně T1D se dosud klinicky nerozvinul (Bosi *et al.* 2006). Snížení střevní propustnosti pak má u animálních modelů potenciál bránit rozvoji diabetu (Visser *et al.* 2010). Schopnost ovlivnit střevní propustnost mají jak některé druhy zejména patogenních bakterií (El Asmar *et al.* 2002) tak prostřednictvím vyplavení proteinu zonulinu také lepek (Lammers *et al.* 2008). Je tak možné, že změny v propustnosti střev a její ovlivnění mikroflórou či lepkem hrají roli v patogenezi T1D.

Autoimunitní destrukce β-buněk pankreatu při T1D je jedním ze základních dogmat diabetologie (DiMeglio *et al.* 2018). Ne rozvoji a průběhu onemocnění se podílí mnoho typů imunitních buněk, jejichž přesná úloha je zatím u většiny nejasná. Klíčová úloha CD4+ i CD8+ T-lymfocytů je již delší dobu známa (Burrack *et al.* 2017), nicméně stejně důležitá může být i nedostatečná imunoregulace respektive **nerovnováha mezi těmito systémy** (Sakaguchi *et al.* 2020). Z tohoto pohledu se nyní studie zaměřují zejména na Foxp3 T-regulační lymfocyty (Aghili *et al.* 2015) a poměrně recentně také na T-regulační lymfocyty typu 1, které produkují velké množství imunoregulačního interleukinu 10 (Mbongue *et al.* 2019).

Lepek je pro svůj vysoce antigenní potenciál známý reakcemi s imunitním systémem (Jelínková *et al.* 2004). **Stimulace prozánětlivých cytokinů po podání lepku** byla pozorována jak *in vitro* (Dall *et al.* 2013) tak *in vivo* na animálních modelech (Chakir *et al.* 2005). Rovněž u NOD-DQ8 myší, které jinak diabetes nerozvinou, byla senzitizace pomocí štěpů gliadinu spojená s indukcí inzulitidy (Galipeau *et al.* 2011). Naopak vysazení lepku ze stravy vede u myší k indukci protizánětlivého vzoru imunitních buněk (Antvorskov *et al.* 2013). Uvedené

studie tak jednoznačně svědčí pro vliv lepku na imunitní funkce prostřednictvím mnohotných imunopatologických cest, z nichž některé se podílí na ostrůvkové autoimunitě.

Tato dizertační práce je **věnována vlivu bezlepkové diety na zbytkovou kapacitu beta-buněk pankreatu, střevní mikrobiom, střevní propustnost a imunitní funkce u dětí s T1D**.

Vzhledem k širokému záběru nabízí tato práce komplexní pohled na působení bezlepkové diety na lidský organizmus jako celek.

2. Hypotézy a cíle práce

2.1. Hypotéza

Zavedení bezlepkové diety po dobu 1 roku u dětských pacientů s nově diagnostikovaným diabetem 1. typu bez céliakie vede k zpomalení rychlosti ztráty zbytkové kapacity beta-buněk pankreatu, zlepšuje metabolickou kompenzaci pacientů, signifikantně mění jejich střevní mikrobiom, střevní propustnost a odpověď imunitního systému.

2.2. Cíle vědecké práce

1) Posoudit vliv bezlepkové diety na zbytkovou kapacitu beta-buněk u dětí s nově diagnostikovaným diabetem 1. typu bez céliakie.
2) Zjistit, zda má bezlepková dieta 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 bezlepkové diety na jeho složení.
4) Posoudit střevní propustnost pacientů na bezlepkové dietě, srovnat ji se stavem před zahájením bezlepkové diety a s kontrolní skupinou pacientů, kteří nikdy nezahájili bezlepkovou dietu.
5) Analyzovat vliv bezlepkové diety na vybrané 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 beta-buněk dárce a popsat změny převzatého střevního mikrobiomu.

3. Materiál a metodika

3.1. Postup řešení postgraduálního studia

1) Nábor subjektů splňujících vstupní kritéria a diagnostikovaných s T1D na Pediatrické klinice 2. LF UK a FN v Motole nebo na Klinice dětí a dorostu 3.LF UK a FN Královské Vinohrady.
2) Sběr klinických dat a odběr laboratorních vzorků na analýzy střevního mikrobiomu a metabolomu, střevní propustnosti a subtypů lymfocytů po dobu sledování subjektů ve studii.
3) Přenos střevního mikrobiomu vybraných pacientů do animálního modelu bezmikrobních NOD myší a sledování incidence diabetu u myších kolonií.
4) Analýza klinických a laboratorních dat subjektů ve studii.
5) Vyhodnocení a publikace výsledků.

Metodika náboru subjektů studie a laboratorních postupů užitých při analýzách jednotlivých složek práce je podrobně uvedena v popisu metodiky disertační práce a jednotlivých publikací, které jsou podkladem předkládané dizertační práce.

4. Výsledky

Zbytková kapacita β-buněk a kompenzace T1D

Ve 12 měsících činil rozdíl AUC C-peptidu mezi pacienty v GFD skupině a kontrolami 205 pmol/L (95 % CI -223 až 633; $p = 0,34$). Při longitudinální analýze všech tří časových bodů klesal C-peptid pomaleji v GFD skupině s rozdílem v trendech 409 pmol/l/rok ($p = 0,04$). 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; $p = 0,02$). 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; $p = 0,07$). 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 ($p = 0,03$).

Změny střevního mikrobiomu po zavedení GFD

Před zahájením GFD se skupiny bakteriálním složením stolice významně nelišily ($p = 0,35$), ovšem během intervence se skupiny začaly významně lišit ($p < 0,001$). Taxa zodpovědná za rozdílné složení byla následující: na úrovni kmene byl kmen Actinobacteria významně méně četný v GFD skupině ($p = 4,12 \times 10^{-8}$); na úrovni rodu byl rod *Bifidobacterium* méně zastoupen v GFD skupině, naopak rody *Roseburia* ($p = 3,29 \times 10^{-4}$), *Lachnospira* ($p = 5,76 \times 10^{-5}$) and *Ruminococcaceae_UCG-013* ($p = 5,76 \times 10^{-5}$) z kmene Firmicutes byly výrazně četnější v GFD skupině.

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 ($p = 5,46 \times 10^{-3}$). Na úrovni rodu jsme po zavedení GFD pozorovali vzestup v zastoupení rodu *Roseburia* ($p = 0,015$) a pokles v

četnosti rodů *Collinsella* ($p = 3{,}89\text{x}10^{-3}$), *Bifidobacterium* ($p= 6{,}80\text{x}10^{-3}$), *Intestinibacter* ($p= 3{,}20\text{x}10^{-2}$), *Romboutsia* ($p= 2{,}90\text{x}10^{-2}$) a *Terrisporobacter* ($p= 4{,}49\text{x}10^{-2}$)**.** V kontrolní skupině jsme žádné změny ve stejné době (tj. mezi vzorky před obdobím kdy byla u GFD skupiny zahájena dieta a poté) nepozorovali ($p= 0{,}180$).

Střevní propustnost po zavedení GFD

Skupiny se ve 12 měsících významně nelišily v poměru vyloučené laktulózy ku mannitolu – průměr v GFD skupině byl 0,035±0,032 a v kontrolní skupině 0,026±0,013 ($p = 0{,}321$). 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; $p = 0{,}199$). 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; $p = 0{,}197$). 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; $p= 0{,}82$).

Rozdíly v subpopulacích T-lymfocytů

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

Přenos střevní mikroflóry do bezmikrobních NOD myší

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. 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). 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.

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, nicméně nekonzistentní mezi koloniemi.

5. Diskuze

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 velmi důležitým parametrem, neboť je asociována s lepší metabolickou kompenzací (Buckingham *et al.* 2015), která vede ke snížení rizika akutních (Sorensen *et al.* 2013) i chronických (Steffes *et al.* 2003) komplikací T1D.

Naše výsledky ohledně prodlouženého období klinické remise a lepší kompenzace se částečně shodují s prací kolektivu autorů z Dánska (Svensson *et al.* 2016). 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 je třeba potvrdit či vyvrátit randomizovanými studiemi s větším množstvím pacientů. Tyto výsledky také primárně nevysvětlují možnou patogenezi pozorovaných asociací, na kterou jsme se zaměřili v dalších částech našeho výzkumu.

V rámci vyšetřování **střevního mikrobiomu** pacientů během naší studie jsme zjistili, že **GFD má potenciál měnit jeho složení**. Pokles v rodu Bifidobacterium po zavedení GFD byl pozorován již v několika studiích jak u pacientů s céliakií, tak u zdravých jedinců (De Palma *et al.* 2009; Bonder *et al.* 2016). 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). Naopak navýšení v četnosti po zavedení GFD jsme pozorovali u rodu *Roseburia*, který 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 částečně 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).

Mezi možnými nositeli vlivu GFD bychom měli vedle střevního mikrobiomu a střevní propustnosti jmenovat také **imunitní systém**. 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. 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). U lidí 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). Námi pozorované **zvýšené množství Tr1 buněk u pacientů v GFD skupině** tak může být jedním z mechanismů, který vysvětluje výše popsané pozitivní asociace spojené s GFD.

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. 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.* 2018).

6. Závěry

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.

7. Conclusions

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.

8. Použitá literatura

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., Oram, R. A. (2018) Type 1 diabetes. *Lancet.* 391(10138):2449-2462.
14. 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.
15. 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.
16. 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.

17. 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.
18. 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.
19. Gao, Z., Yin, J., Zhang, J. …Ye, J. (2009) Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes.* 58(7):1509-17.
20. 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.
21. 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.
22. Hooper, L. V., Littman, D. R., Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science.* 336(6086):1268-73.
23. Insel, R., Knip, M. (2018). Prospects for primary prevention of type 1 diabetes by restoring a disappearing microbe. *Pediatric Diabetes.* 19(8):1400-1406.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Sakaguchi, S., Mikami, N., Wing, J. B. …Ohkura, N. (2020) Regulatory T Cells and Human Disease. *Annual Reviews of Immunology*. 26(38)541-566.

35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. Todd, J. A., Knip, M., Mathieu, C. (2011) Strategies for the prevention of autoimmune type 1 diabetes. *Diabetic Medicine.* 28(10):1141-3.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.

CURRICULUM VITAE Vít Neuman, MUDr.

Pediatrická klinika 2. LF UK a FN Motol
2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
V Úvalu 84
150 06 Praha 5

Telefon: + 420 773 608 308, + 420 224 432 090

Fax: + 420 22443 2020

e-mail: Vit.Neuman@fnmotol.cz

Trvalé bydliště: Na Spojce 968/7, Praha 10, 101 00, ČR

Kontaktní adresa: Pod Terebkou 7, Praha 4, 140 00, ČR

Datum narození: 17.1.1991

Občanství: ČR

VZDĚLÁNÍ:

10/2016–dosud	Ph.D.	2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha Doktorské studijní programy v biomedicíně Oborová rada: Fyziologie a patofyziologie člověka Efekt bezlepkové diety na zbytkovou kapacitu beta-buněk, imunitní funkci a střevní mikrobiom dětí s nově manifestovaným diabetem 1. typu
2010–2016	MUDr.	2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha Obor: všeobecné lékařství
2002–2010	maturita	Gymnázium Voděradská, Praha

ZAMĚSTNÁNÍ:

10/2016 - dosud	Lékař, Pediatrická klinika 2. LF UK a FN Motol, Praha

STÁŽE:

02/2019	European Society for Pediatric Endrocrinology Winter School, Baku, Ázerbajdžán (2 týdny)
09-12/2015	Fakulteit Geneeskunde en Gezondheidswetenschappen, Universiteit Gent, Gent, Belgie, Pediatrické a Infekční oddělení, Erasmus+ program (3 měsíce)

ČLENSTVÍ V ODBORNÝCH SPOLEČNOSTECH:

- Pediatrická společnost lékařské společnosti J. E. Purkyně (2019 - dosud), člen

- Diabetologická společnost lékařské společnosti J. E. Purkyně (2018 - dosud), člen

GRANTY:

- **AZV** (2015–2019), spoluřešitel, téma „*The effect of gluten-free diet on residual beta-cell capacity, immune function and gut microbiome in children with newly diagnosed type 1 diabetes*“ (4 roky)

- **AZV** (2021–2025), spoluřešitel, téma „*Low-cabrohydrate diet in type 1 diabetes:effects on glycemic control and islet autoimmunity* “ (4 roky)

OCENĚNÍ:

- Cena studentské poroty za nejlepší přednášku na Vědecké konferenci 2. LF UK, 2020
- Cena České endokrinologické společnosti za nejlepší publikaci autora do 35 let v r. 2019
- Cena České pediatrické společnosti za nejlepší publikaci autora do 35 let v r. 2019
- Cena České diabetologické společnosti za nejlepší publikaci autora do 35 let v r. 2019
- Cena České endokrinologické společnosti za nejlepší publikaci autora do 35 let v r. 2020

Přehled publikační aktivity 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)**

Přednášky, plakátová sdělení na odborných setkáních

Neuman et al, Gluten-free diet in children with recent onset type 1 diabetes: a 12-month intervention trial. 45th annual conference of International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes 2019, Boston, USA

Neuman et al, Gluten-free diet in children with recent onset type 1 diabetes: a 12-month intervention trial. 58th annual meeting of European Society for Pediatric Endocrinology 2019, Vídeň, Rakousko

Neuman et al, Gluten-free diet in children with recent onset type 1 diabetes: a 12-month intervention trial. 79th scientific session of American Diabetes Association 2019, San Francisco, USA

Neuman et al, Gluten free diet – 6 months of its effect on residual beta-cell capacity in patients with recent onset type 1 diabetes? 44th annual conference of International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes 2018, Hyderabad, Indie

Neuman et al, Can mice reproduce the human gut microbiome? 43rd annual conference of International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes 2017, Innsbruck, Rakousko

Mohou myši reprodukovat lidský střevní mikrobiom? V. Neuman, O. Cinek, D.P. Funda, T. Hudcovic, L. Kramná, L. Petruželková, Š. Průhová, Z. Šumník, 54. Diabetologické dny, Luhačovice, duben 2018, abstrakt publikován v Diabetologie, Metabolismus, Endokrinologie, Výživa