Oponentský posudek disertační práce

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

MUDr. Vít Neuman, 2. LF UK

---

1. **Aktuálnost řešeného tématu**
   Řešené téma **je velmi aktuální**.
   Diabetes mellitus 1. typu (T1D) patří mezí častá a závažná autoimunitní onemocnění dětského věku. Incidence a prevalence T1D představuje značnou zátěž nejen zdravotní, ale socioekonomickou. Stále se hledají cesty, kterými ovlivnit rychlost jeho progrese a destrukce beta buněk pankreatu. V patofyziologii T1D hrají roli nejen endogenní faktory, ale také environmentální. Jejich rozpoznání a ovlivnění je jedním z úkolů současné diabetologie.
   Lepek, známý svými prozánětlivými účinky, spolurozhoduje o vzniku a průběhu T1D. Stále je zkoumán vliv bezlepkové stravy nejen na jedince s celiakií, ale různými jinými patologickými stavy, např. T1D.
   Na střevní mikrobiom a střevní propustnost se soustřeďuje právem pozornost výzkumů v poslední době s následnými snahami o jejich klinické využití.
   V souvislosti s T1D je zatím známo velmi málo.
2. **Hypotéza, cíle a jejich splnění**
   Zavedení GFD (gluten free diet) po dobu 1 roku u dětí s nově diagnostikovaným T1D bez celiakie vede ke zpomalení rychlosti ztráty zbytkové kapacity beta-buněk pankreatu, zlepšuje metabolickou kompenzaci pacientů, signifikantně mění jejich střevní mikrobiom, střevní propustnost a odpověď imunitního systému.
   1. Posoudit vliv GFD na zbytkovou kapacitu beta-buněk u dětí s nově diagnostikovaným T1D bez celiakie.
   2. Zjistit, zda má GFD u těchto dětí vliv na metabolickou kompenzaci, délku parciální remise a dávku inzulínu.
   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 T1D bez celiakie.
   6. Zhodnotit, zda může přenos lidského střevního mikrobiomu snížit incidenci diabetu 1. typu u bezmikrobních NOD myší, a to v závislosti na rychlosti progrese ztráty funkce beta-buněk dárce a popsat změny převzatého střevního mikrobiomu.

   Cíle byly splněny získáním dat, jejich vyhodnocením a odpověďmi na položené otázky (viz dále).

3. **Použité metody a postupy**
   Jsou podrobné, moderní a precizní.
   Vstup pacientů do studie má jasná vstupní kritéria.
   Vstupní charakteristiky pacientů ve studii jsou jasně a dostatečně podrobně popsány.
   Velikost souborů kontrolní skupiny (19 dětí) a intervenční (20) je dostatečná.

Protokol studie, studijní návštěvy, jejich náplně a rozřazení pacientů jsou jasně a podrobně popsány, stejně tak hodnocení zbytkové kapacity beta-buněk a kompenzace T1D ((MMTT – test smíšenou stravou k posouzení plochy pod křivkou (AUC) C-peptidu, dávka inzulínu za den, hodnota glykovaného hemoglobinu (HbA1c), na inzulinovou dávku adjustovaný hemoglobin (IDAA1c, marker částečné remise), zaslepený kontinuální monitor glykémie (CGM) na dobu 7 dnů, průměrná glykémie (AG), glykemická variabilita dle směrodatné odchylky (SD) všech měření glykémie, čas v cílovém rozmezí (3.9 – 10.0 mmol/l), čas v hypoglykémii (pod 3.9 mmol/l a čas v hyperglykémii (nad 10 mmol/l)).
Pomocí standardizovaného dotazníku PedsQL 3.2 modul pro diabetes byla hodnocena kvalita života dětí.
Dodržování bezlepkové diety bylo posuzováno rozborem jídelníčků pomocí programu NutriServos PROFI, alespoň 3 vzorky stolice byly u každého pacienta ve studii analyzovány na obsah imunogenního peptidu lepku (GIP) se senzitivitou 98,5 % a specifitou 100 %. Pozitivita v jakémkoli vzorku během období dodržování GFD byla důvodem k vyřazení pacienta z analýzy.
Detailně je popsán sběr vzorků stolice a analýza složení střevního mikrobiomu (bioinformatické postupy s analýzou bakteriální rRNA).
K posouzení střevní propustnosti byl měřen poměr vylučování laktulózy a mannitolu do moči po vypití roztoku laktulózy a manitolu analýzou kapalinovou chromatografií a stanovením koncentrace proteinu zonulinu v séru (ELISA kit).
Podrobně je popsána analýza subpopulací T-lymfocytů ve vzorcích periferní krve průtokovou cytometrií.
Pět pacientů bylo vybráno dle rychlosti ztráty zbytkové kapacity beta-buněk v MMTT (2 rychle, 3 pomalu) jako dárci stolice k transplantaci mikrobiomu do bezmikrobních NOD myší. Postup je podrobně popsán. Vzorky stolic myší byly analyzovány popsaným procesem. U 4-6 utracených myší z každé skupiny byly Langerhansovy ostrůvky zhodnoceny histologicky na skórování inzulitidy a vzorky lymfatických uzlin byly analyzovány na T regulační lymfocyty průtokovou cytometrií.
Výsledky 19 dětí v kontrolní a 20 v GFD skupině, analýzy jídelníčků, dotazníků kvality života, vztahy mezi střevními mikrobiálními komunitami u pacientů, rozdíly mezi subtypy lymfocytů a rozdíly v incidenci diabetu u myší byly podrobně statisticky zpracovány.

4. **Výsledky práce**

Jsou zpracovány podrobně, dokumentovány v obrázcích, tabulkách a grafech.

1. Zavedení bezlepkové diety po dobu 1 roku krátce po diagnóze T1D u dětí bez celiakie je asociováno s pomalejším úbytkem zbytkové kapacity beta-buněk (rozdíl v AUC C-peptidu, C-peptidu nalačno).
2. Dodržování GFD bylo po 1 roce asociováno s lepší kompenzací T1D (hodnota HbA1c) a prodloužením a prohloubením parciální remise onemocnění (IDAA1c), nikoli však s celkovou denní dávkou inzulínu a parametry kontinuální monitorace glykémie (AG, SD, čas v cílovém rozmezí, v hypo- a hyperglykémii) hodnocené při ukončení studie.
3. Skupiny na GFD a kontrolní se statisticky významně nelišily v žádném mikro- ani makronutrientu stravy a v žádném aspektu dotazníky zjišťované kvality života.
4. Před zavedením GFD se střevní mikrobiom intervenční a kontrolní skupin významně nelišil. Statisticky významné rozdíly se objevily po zavedení GFD.

5. GFD nebyla asociována se statisticky významnou změnou střevní propustnosti měřenou koncentrací sérového zonulinu ani exkrečního poměru laktulózy a mannitolu.
6. U pacientů na GFD autoři pozorovali po 12 měsících statisticky významné změny v některých populacích T-lymfocytů (nižším množství efektorových paměťových (TEMRA) T-lymfocytů a významné zvýšení množství IL-10 produkujících T-regulačních lymfocytů typu1.
7. Přenos lidského střevního mikrobiomu do bezmikrobních NOD myší vedl ke snížení incidence diabetu u těchto myší. Množství Langerhansových ostrůvků postižených insulitidou bylo u myší rovněž významně nižší po přenosu mikrobiomu. Rychlost progrese ztráty kapacity beta-buněk lidského dárce na bezmikrobní NOD myši střevním mikrobiomem přenositelná není.

5. Formální zpracování

Vynikající (včetně úvodní teoretické části), věcné, srozumitelné, vhodně dokumentované obrázky, tabulkami a grafy. Praktická část logicky navazuje na úvodní část teoretickou. Pouze jediný překlep, str. 43, místo odkazu na kapitolu 8.2.3 je správně 8.2.5., sjednotit disertační x dizertační? Práce cituje celkem 165 zdrojů bez autocitací, z toho 101 z posledních 10 let.

6. Vlastní podíl doktoranda na práci

Je velký. Výsledky práce byly získány zhodnocením dat z longitudinálního sledování dětí s nově diagnostikovaným diabetem 1. typu. Doktorand prováděl klinická vyšetření pacientů a podílel se na laboratorním zpracování vzorků a následné analýze, zhodnocení i statistickém zpracování výsledků projektu a vypracování disertační práce.

7. Úroveň publikací, součástí disertační práce

Původní vědecké práce in extenso, které jsou podkladem disertace s impakt faktorem jsou 2 **(IF 7,5 a IF 5.9)** a tímto naplňují požadavky Ph.D.

8. Význam práce pro další rozvoj vědního oboru

Práce dosáhla řady výsledků, které napomáhají rozvoji oboru dětské diabetologie a na které **je možno navázat dalšími výzkumy**, např. v oblasti působení lepku na lidský organizmus a důsledky jeho vyloučení ze stravy, rozšířením bádání v oblasti přenášení lidského střevního mikrobiomu, ve studiu vlivu jiných environmentálních faktorů na autoimunitní onemocnění dětského věku včetně T1D atp.

9. Možnosti aplikace výsledků v praxi

Jsou. Kupříkladu zvážení nasazení bezlepkové diety po manifestaci cukrovky 1. typu u dětí bez celiakie.

10. Závěrečné zhodnocení

Práce se zabývá významným aktuálním tématem, stanovuje 6 jasných cílů, které se podařilo získanými výsledky splnit. Použité metody a postupy, protokol studie, výběr účastníků, velikost souborů, metody získávání výsledků a jejich vyhodnocení jsou moderní, precizní a jasné. Autor má v práci rozhodující podíl. Úroveň publikací autora, které jsou součástí disertační práce jsou vysoké (IF 7.5 a 5.9). Práce je významná pro další rozvoj vědního oboru a dává možnosti využití v klinické praxi.

Předložená práce splňuje nároky kladené na disertační práci a prokazuje předpoklady autora k samostatné vědecké práci.

Doporučuji udělení titulu Ph.D.

11. Případné otázky k obhajobě:

1. Doporučil by Dr. Neuman dítěti bez celiakie bezlepkovou stravu dnes v době manifestace cukrovky 1. typu?
2. Jaké další výzkumy je možno na základě výsledků disertační práce očekávat?

V Ústí nad Labem 28. 8. 2021 MUDr. Jaroslav Škvor, CSc.