

**Univerzita Karlova v Praze**

**3. lékařská fakulta**

Studijní program: Biomedicína  
Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Iva Hoffmanová

**Diabetes mellitus a porucha bariérové funkce střeva**

Diabetes mellitus and impairment of intestinal barrier function

Dizertační práce

Školitel: prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.

Praha 2015

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem dizertační práci na téma „Diabetes mellitus a porucha bariérové funkce střeva“ zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala 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. Prohlašuji, že odevzdaná tištěná verze dizertační práce a verze elektronická nahraná do Studijního informačního systému (SIS) 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy jsou totožné.

V Praze dne 15. 6. 2015

MUDr. Iva Hoffmanová

## Identifikační záznam

Hoffmanová, Iva. *Diabetes mellitus a porucha bariérové funkce střeva. [Diabetes mellitus and impairment of intestinal barrier function]*. Praha, 2015. 122 s., 2 příl. Dizertační práce.

Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta, 2. interní klinika. Školitel prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.

**Klíčová slova:** bariérová funkce tenkého střeva, diabetes mellitus, celiakie, cytokeratin 18 caspase-cleaved fragment, intestinal fatty acid-binding protein, solubilní CD14

**Key words:** intestinal barrier function, diabetes mellitus, celiac disease, cytokeratin 18 caspase-cleaved fragment, intestinal fatty acid-binding protein, soluble CD14

## **Předmluva a poděkování**

Předkládaná dizertační práce vznikla v rámci spolupráce 2. interní kliniky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Laboratoře buněčné a molekulární imunologie Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i. Oběma institucím tímto děkuji za to, že umožnily realizaci projektu a poskytnuly vybavení a zázemí.

Poděkování bych ráda vyjádřila především svému školiteli, prof. MUDr. Michalovi Andělovi, CSc., za odborné vedení, skvělé podněty a připomínky při přípravě dizertační práce, ale i za probuzení zájmu o studium širších souvislostí jevů pozorovaných v klinické praxi.

Zvláštní poděkování patří prof. MUDr. Heleně Tlaskalové-Hogenové, DrSc. a Ing. Danieli Sánchezovi, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu Akademie věd za odborné konzultace, cenné rady a za přátelský přístup a vztah, který naši spolupráci velmi obohacuje. Děkuji rovněž Doc. RNDr. Ludmile Tučkové, DrSc., Ing. Věře Hábové a RNDr. Daně Borovské z Mikrobiologického ústavu Akademie věd, za jejich pomoc v laboratoři i za jejich podíl na výsledcích naší práce.

Bc. Janě Potočkové z 2. interní kliniky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy jsem vděčna za její činnost při prvotním zpracování vzorků sér a za další technickou pomoc.

Práce vznikla za podpory grantů: NT13483 (Interní grantová agentura Ministerstva zdravotnictví ČR), GA13-14608S a GAP304/11/1252 (Grantová agentura České republiky), TA01010737 a TA04010762 (Technologická agentura České republiky). Prof. MUDr. Heleně Tlaskalové-Hogenové, DrSc. a Ing. Danieli Sánchezovi, Ph.D. děkuji za zprostředkování finančních prostředků z těchto grantů.

Dále bych ráda vyjádřila svůj dík všem spolupracovníkům 2. interní kliniky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, a rovněž své rodině a přátelům za trpělivost a podporu.

## OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	6
1. ÚVOD .....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	10
2.1. Bariérová funkce tenkého střeva .....	10
2.1.1. Intestinální permeabilita .....	13
2.1.2. Intestinální mikrobiota .....	14
2.2. Diabetes mellitus 1. typu a intestinální bariéra .....	16
2.2.1. Diabetes mellitus 1. typu a intestinální mikrobiota .....	17
2.2.1.1. Intestinální mikrobiota u zvířecích modelů autoimunitního diabetes mellitus .....	17
2.2.1.2. Intestinální mikrobiota u pacientů s diabetes mellitus 1. typu .....	18
2.2.2. Diabetes mellitus 1. typu a intestinální permeabilita .....	18
2.2.2.1. Intestinální permeabilita u zvířecích modelů autoimunitního diabetes mellitus .....	18
2.2.2.2. Intestinální permeabilita u pacientů s diabetes mellitus 1. typu .....	19
2.2.2.3. Intestinální permeabilita a mikroskopické změny sliznice tenkého střeva u pacientů s diabetes mellitus 1. typu .....	19
2.2.3. Diabetes mellitus 1. typu a alterace slizničního imunitního systému .....	20
2.2.3.1. Aktivace intestinální imunity u diabetes mellitus 1. typu .....	20
2.2.3.2. Autoimunitní reakce proti $\beta$ -buňkám jako důsledek reaktivity proti potravinovým a bakteriálním antigenům .....	21
2.2.3.2.1. Gliadin a diabetes mellitus 1. typu .....	21
2.2.3.2.2. Proteiny kravského mléka, bovinní inzulín a diabetes mellitus 1. typu .....	23
2.2.3.2.3. Vliv enterální infekce při rozvoji diabetes mellitus 1. typu .....	24
2.3. Diabetes mellitus 2. typu a intestinální bariéra .....	25
2.3.1. Chronická „low-grade“ endotoxémie u diabetes mellitus 2. typu .....	27
2.3.2. Ovlivnění střevní mikrobioty antibiotiky, prebiotiky, probiotiky a fekální transplantací u diabetes mellitus 2. typu .....	28
2.3.3. Vliv nutrientů na sérovou hladinu lipopolysacharidu – úloha intestinální permeability .....	30
2.3.4. Sekrece střevních peptidů – modulace integrity intestinální bariéry prostřednictvím glucagon-like peptidu 2 .....	31
2.3.4.1. Střevní mikrobiota moduluje sekreci intestinálního peptidu YY .....	31
2.3.4.2. Střevní mikrobiota moduluje sekreci intestinálního glucagon-like peptidu 1 .....	32
2.3.5. Zvýšené energetické využití potravy u diabetes mellitus 2. typu .....	32
2.3.6. Střevní mikrobiota reguluje složení mastných kyselin tukové tkáně a jater .....	33
3. ZÁVĚR TEORETICKÉ ČÁSTI .....	34

4. EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE .....	36
4.1. Úvod experimentální práce .....	36
4.1.1. Markery apoptózy epitelových buněk .....	36
4.1.1.1. Fragmenty cytokeratinu 18 .....	38
4.1.2. Metody neinvazivního testování poškození enterocytů a integrity enterocytární vrstvy .....	40
4.1.2.1. Markery intestinálního epitelového poškození .....	40
4.1.2.2. Markery poškození tight junctions .....	41
4.1.2.3. Testování intestinální permeability .....	42
4.1.2.4. Markery translokace bakterií nebo jejich produktů .....	43
4.1.3. Marker aktivace systému vrozené imunity a translokace lipopolysacharidu .....	44
4.1.3.1. Některé aspekty vrozené imunitní odpovědi v tenkém střevě .....	45
4.1.3.2. Solubilní CD14 .....	46
4.1.4. Celiakie .....	48
4.1.4.1. Definice, klinické projevy, diagnostika a léčba celiakie .....	48
4.1.4.2. Porucha mechanismů adaptivní a vrozené imunity u celiakie .....	50
4.2. Hypotézy, cíle práce .....	51
4.3. Metodika .....	52
4.3.1. Výběr pacientů a kontrolní skupiny .....	52
4.3.2. Popis rutinních laboratorních a klinických vyšetření .....	54
4.3.3. Popis experimentálních laboratorních vyšetření .....	56
4.3.4. Statistické zpracování .....	56
4.4. Výsledky .....	57
4.4.1. Hypotéza 1 .....	60
4.4.2. Hypotéza 2 .....	61
4.4.3. Hypotéza 3 .....	69
4.4.4. Hypotéza 4 .....	74
4.5. Diskuze .....	75
4.5.1. Hypotéza 1 .....	75
4.5.2. Hypotéza 2 .....	83
4.5.3. Hypotéza 3 .....	85
4.5.4. Hypotéza 4 .....	86
4.6. Souvislosti s klinickou praxí .....	89
5. ZÁVĚR .....	94
6. SOUHRN .....	96
7. SUMMARY .....	98
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	100
9. PŘÍLOHY .....	116
10. SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA .....	120

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BB-DP rats	biobreeding diabetes prone rats (potkani náchylní k diabetes mellitus)
BB-DR rats	biobreeding diabetes resistant rats (potkani rezistentní k diabetes mellitus)
BMI	body mass index
C	zdravé kontroly
CD14	cluster of differentiation antigen 14
mCD14	membránový CD14
sCD14	solubilní CD14
CLD	celiakie (celiac disease) recentně diagnostikovaná
CLD-GFD	celiakie léčená bezlepkovou dietu (GFD-gluten free diet)
CRP	C-reaktivní protein
cCK-18	caspase-cleaved cytokeratin 18 fragment
DAMP	damage-associated molecular pattern
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	endomysial antibodies (protilátky proti endomysiu)
EndoCAb	endotoxin core antibody
FABP	fatty acid binding protein (protein vázající mastné kyseliny)
FIFA	fasting-induced adipose factor
GAD	glutamic acid decarboxylase (dexarboxyláza kyseliny glutamové)
GADA	glutamic acid dexarboxylase antibodies (protilátky proti dexarboxyláze kyseliny glutamové)
GFD	gluten free diet (bezlepková dieta)
GIP	glucose-dependent insulinotropic polypeptid/gastric inhibitory polypeptid
GLP-1	glucagon-like peptid (peptid podobný glukagonu) 1
GLP-2	glucagon-like peptid (peptid podobný glukagonu) 2
HOMA-IR	homeostatic model assessment-insulin resistance (index inzulínové rezistence)
hTG	human thyroglobulin (lidský thyreoglobulin)
I-FABP	intestinal fatty acid binding protein (protein vázající mastné kyseliny ve střevě)
IELs	intraepiteliální lymfocyty
IAA	insulin auto-antibodies (protilátky proti inzulínu)

IA2	islet antigen 2/tyrosine phosphatase-like insulinoma antigen 2
ICA	islet cell antibodies (protilátky proti pankreatickým ostrůvkům)
IgA	imunoglobulin A
IFN	interferon
IL	interleukin
JNK1	Jun N-terminální kináza 1
LAL	limulus amebocyte lysate
LPS	lipopolysacharid
MAMP	microbe-associated molecular pattern
mCD14	membránový CD14
MPRR	microbial pattern-recognition receptors
NASH	nealkoholická steatohepatitída
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B
NLR	NOD-like receptor, nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing receptors (NOD1 a NOD2)
NOD1	nucleotide-binding oligomerization domain protein-1
NOD2	nucleotide-binding oligomerization domain protein-2
NOD mice	non-obese diabetic mice (neoběžní diabetické myši)
PYY	intestinální peptid YY
PRR	pattern recognition receptor
RNA	ribonukleová kyselina
sCD14	solubilní CD14
tTG	tissue transglutaminase (tkáňová transglutamináza)
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$ (transformující růstový faktor $\beta$ )
TLR	toll-like receptor
TLRs	toll-like receptory
TRL4	toll-like receptor 4
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
TPO	thyroid peroxidase (thyreoidální peroxidáza)
T1D	diabetes mellitus 1. typu
T1D/INS	diabetes mellitus 1. typu s probíhající inzulinitidou
T2D	diabetes mellitus 2. typu
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)



## 1. ÚVOD

Diabetes mellitus je jedním z nejčastějších chronických onemocnění v rozvinutých zemích světa a zvyšující se prevalence umocňuje jeho celospolečenskou závažnost. Podle WHO v r. 2010 trpělo tímto onemocněním celosvětově více než 220 miliónů osob a mezi léty 2010 a 2030 má odhadovaná prevalence diabetes mellitus v rozvojových zemích vzrůst o 69 % a ve vyspělých zemích o 20 %; jeho celosvětový výskyt mezi dospělými (ve věku 20-79 let) má činit v roce 2030 7,7 %, tj. 439 milionů dospělých (Shaw et al., 2010). Příčina tohoto nárůstu je přisuzována měnícímu se životnímu stylu vedoucímu k redukci fyzické aktivity a k obezitě, změnám v dietě a v hygienickém standardu populace. Pozitivní korelace mezi zlepšením hygienického standardu populace a rozvojem diabetes mellitus koresponduje s hygienickou hypotézou, podle které je snížená mikrobiální stimulace organismu asociována s vyšším rizikem rozvoje autoimunitních a imunologicky mediovaných chorob a alergií (Kolb a Elliott, 1994). Rozvoj těchto onemocnění je však spojován i s toxickými environmentálními faktory, jejichž možný mechanismus působení vyjadřuje „overload“ hypotéza. Tato hypotéza předpokládá vliv nefyziologického zatížení beta buněk pankreatu způsobený inzulínovou rezistencí a dlouhodobým fyzickým i psychickým stresem. Vliv chronického stresu může vést k apoptóze beta buněk či k jejich poškození autoimunitní reakcí (Wild et al., 2004; Dahlquist, 2006).

Ačkoliv se diabetes mellitus typu 1 a typu 2 odlišují svou patogenezi i klinickou prezentací, u obou onemocnění se vyskytují morfologické a funkční změny tenkého střeva charakterizované zvýšením slizniční plochy střeva včetně zvýšení počtu pohárkových buněk či chybění intersticiálních Cajalových buněk (Rayner a Horowitz, 2006; Zhao et al., 2006). Délka klků tenkého střeva a proliferace intestinálních buněk koreluje pozitivně s hladinou glykosylovaného hemoglobinu (HbA1c), indikátoru chronické hyperglykémie (Adachi et al., 2003). Pro oba typy diabetes mellitus je charakteristická také porucha střevní motility způsobená diabetickou autonomní neuropatií, vedoucí k retenci střevního obsahu a následnému rozvoji střevní dysbiózy, k porušení intestinální bariéry a zvýšení střevní propustnosti (Virally-Monod et al., 1998). S poruchou střevní motility a permeability způsobené dysbiózou či přímo prostřednictvím hyperglykémie souvisí i vznik enteropatií manifestovaných u diabetických pacientů obstrukcí či průjmy (Damci et al., 2003; Shakil et

al., 2008). *Vice versa*, existují důkazy označující alteraci bariérové funkce tenkého střeva jako iniciační faktor vzniku diabetes mellitus (Vaarala, 2008).

Intestinální bariérová funkce zahrnuje aktivní, komplexní a koordinovaný homeostatický systém, jehož klíčovými prvky jsou intestinální permeabilita, intestinální imunita a intestinální mikrobiota (Tlaskalová-Hogenová a Městecký, 2012). Je známo, že bariérová funkce střeva je výrazně narušena u řady gastrointestinálních onemocnění jakými jsou gastrointestinální infekce, nespecifické střevní záněty, celiakie, nealkoholická steatohepatitida, syndrom dráždivého tračníku, enteropatie navozené užíváním nesteroidních antirevmatik, intestinální ischemie, ale také u některých autoimunitních a systémových onemocnění (Arrieta et al., 2006; Catalioto et al., 2011). Porucha intestinální bariéry se dále podílí i na rozvoji sepse a multiorgánového selhání u pacientů se sníženou střevní perfuzí následkem velkého operačního výkonu, traumatu či šoku (Grootjans et al., 2010).

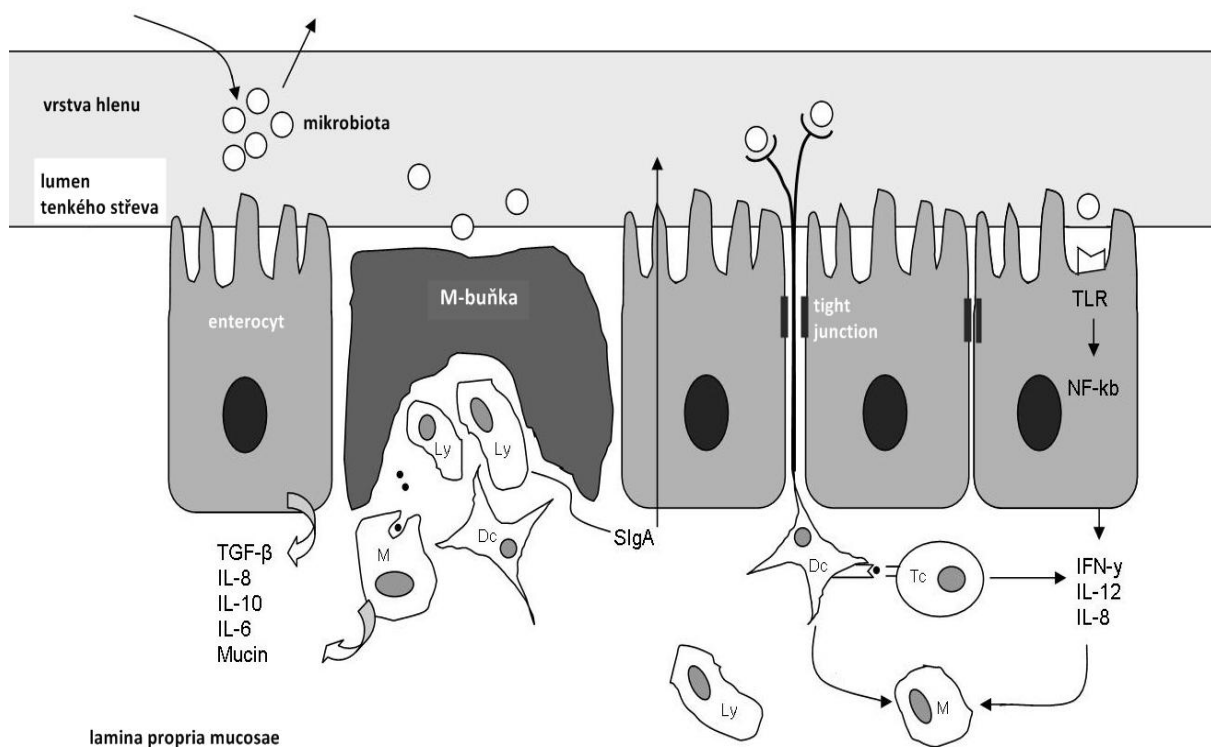
Teoretická část předkládané dizertační práce popisuje současné znalosti o funkci intestinální bariéry a jejím patofyziologickém vztahu k diabetes mellitus 1. typu a 2. typu. Vlastní experimentální práce byla zaměřena na posouzení poruchy intestinální bariéry na úrovni epitelu tenkého střeva u pacientů s oběma typy diabetes mellitus a charakter této poruchy srovnávala s modelovým onemocněním tenkého střeva, provázeným poruchou bariérové funkce střeva, jakým je celiakie. V séru pacientů a kontrolní skupiny jsme stanovovali tři markery, z nichž každý testoval odlišný aspekt poruchy epitelové intestinální bariéry: apoptózu enterocytů, poškození enterocytů a aktivaci systému vrozené imunity. V závěru dizertační práce naznačujeme mimo jiné i potenciální využití námi studovaných neinvazivních markerů poruchy intestinální bariéry v klinické praxi a budoucí možnosti modulace intestinální bariéry, jež by mohly přispívat k léčbě obou typů diabetes mellitus i ostatních chorob provázených poruchou bariérové funkce tenkého střeva.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST: Diabetes mellitus a porucha intestinální bariérové funkce střeva

### 2.1. Bariérová funkce tenkého střeva

Stěna tenkého střeva tvoří anatomickou a imunologickou bariéru, souhrnně nazývanou intestinální bariéra (obrázek 1). Intestinální bariéra odděluje antigenní komponenty zevního prostředí (tj. v lumen obsažený chymus a mikrobiotu) od vnitřního prostředí organismu. Základní úlohou funkční intestinální bariéry je schopnost rozpoznávání patogenních agens a potravních antigenů od nepatogenních a navozování tzv. orální tolerance imunitním systémem.

**Obrázek 1. Schéma epitelové části intestinální bariéry.** Zkratky: TLR – toll like receptor; NF-kb - nukleární faktor kappa B; IFN- $\gamma$  – interferon gamma; IL- interleukin; TGF- $\beta$  – transforming growth factor beta; SIgA – sekreční imunoglobulin A; Dc – dendritické buňky; M – makrofágy; Ly – lymfocyty. Upraveno podle: West et al., 2009.



Mechanickou a strukturální oporu intestinální bariéry tvoří stěna tenkého střeva s funkčně diferencovanou epitelovou slizniční výstelkou, která je v anatomickém kontaktu s buňkami nervového, endokrinního a imunitního systému. Jednovrstevná výstelka epitelových střevních buněk má původ v multipotentní kmenové buňce přítomné v slizničních kryptách. Tato kmenová buňka se diferencuje do čtyř hlavních epitelových buněk: (1) absorpční enterocyty, které představují více než 80 % epitelových buněk tenkého střeva, (2) pohárkové buňky produkující mucin (směs glykoproteinů a vody), jež pokrývá a chrání slizniční povrch, a trefoilové peptidy, jež jsou nutné pro epitelový růst a opravu poškození, (3) enteroendokrinní buňky, které secernují peptidové hormony a (4) Panethovy buňky. Epitelové buňky společně s lamina propria mucosae tvoří sliznici střeva. Enterocyty jsou vysoce metabolicky aktivní buňky s biologickým poločasem 3 – 4 dny, kdy na vrcholcích klků hynou apoptózou a uvolňují se do střevního lumen. Kontinuita střevního povrchu je zajišťována jejich neustálou obměnou. Enterocyty vznikají v mitotických zónách střevních krypt, ze kterých se pohybují po vertikální ose klku k jeho vrcholu (Sansonetti, 2004).

Optimální funkci intestinální bariéry umožňují i chemické látky secernované do lumen gastrointestinálního traktu: kyselina chlorovodíková, pepsin, žluč, pankreatické a střevní proteázy, sekreční imunoglobuliny a antimikrobiální látky. Antimikrobiální látky jsou produkovány Panethovými buňkami, jež jsou lokalizovány v kryptách tenkého střeva a mají schopnost rozpoznávat přítomnost bakterií a bránit kolonizaci krypt uvolňováním antimikrobiálních peptidů a proteinů (defenziny, lysozym) (Vaishnava et al., 2008).

Imunologická bariéra je zajištěna kooperací řady buněk. V lamina propria mucosae se nacházejí imunitní buňky (antigen-prezentující buňky, dendritické buňky, T-lymfocyty, B-lymfocyty, plasmatické buňky, makrofágy, mastocyty) fungující jako senzory pro cizorodé antigeny, mikrobiální patogeny či komenzální mikroorganismy a účastníci se imunitní odpovědi. Mezi enterocyty jsou vmezeřeny intraepiteliální T-lymfocyty (IELs). Rovněž samotné enterocyty jsou aktivní součástí vrozeného imunitního systému, kromě svých absorpčních a metabolických funkcí exprimují receptory schopné rozpoznávat bakteriální antigeny (Hisamatsu et al., 2003). V rámci systému vrozené imunity je antigenní rozpoznávání v tenkém střevě závislé na přítomnosti transmembranových či intracelulárních receptorů, nazývaných pattern recognition receptory (PRR), které zahrnují rodiny toll-like receptorů (TLR) a NOD-like receptorů (NLR). PRR jsou exprimovány imunitními buňkami v

lamina propria mucosae a rovněž i intestinálními epitelovými buňkami; jejich exprese se zvyšuje při zánětu. Vazba antigenů na PRR stimuluje intracelulární signální kaskády (NF- $\kappa$ B, AKT/phosphatidylinositol-3'-kinázová a mitogen-aktivovaná proteinkinázová dráha) vedoucí k imunitní odpovědi – k produkci cytokinů a chemokinů, které atrahují imunitní buňky zúčastněné v akutní zánětlivé odpovědi (Baumgart a Dignass, 2002; Arrieta et al., 2006; Mukherjee et al., 2008; Santaolalla a Abreu, 2012).

Transport antigenů ze střevního lumen do subepitelových vrstev probíhá paracelulárně – skrze těsné spoje (tight junctions) mezi enterocyty či prostřednictvím specializovaných M-buněk a dendritických buněk. M-buňky jsou přímo distribuovány mezi enterocyty, kdežto dendritické buňky jsou lokalizovány v lamina propria mucosae a svými výběžky pronikají epitelovou vrstvou do lumen střeva (Boscardin et al., 2006). Prezentace lumenálních antigenů se uskutečňuje prostřednictvím dendritických buněk a M-buněk. Tyto antigen-prezentující buňky předkládají antigeny T- a B-lymfocytům v lamina propria mucosae, čímž dochází k indukci imunitní odpovědi. Hlavní součástí humorální imunitní reakce je sekrece imunoglobulinu A (IgA) plasmatickými buňkami přítomnými v lamina propria mucosae. IgA je z lamina propria mucosae transportován enterocyty na slizniční povrch, kde se účastní tzv. imunitní exkluze antigenů (Sansonetti, 2004).

Integrální úlohu v udržení správné funkce sliznice gastrointestinálního traktu, a tedy i bariérové funkce, mají komenzální bakterie. Komenzální mikrobiota zahrnující přibližně  $10^{14}$  bakterií působí jako trofický kompetitor a antagoista patogenních mikroorganismů. Bakteriální produkty stimulují proliferaci epitelových buněk, sekreci mucinu pohárkovými buňkami a produkci defenzinů Panethovými buňkami. K udržení slizniční homeostázy přispívá komenzální mikrobiota svou imunomodulační aktivitou: kontroluje zánětlivou odpověď prostřednictvím regulace exprese transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B v epitelových buňkách. Mikrobiota dále stimuluje (přímo či prostřednictvím  $T_H2$ ,  $T_H3$  a  $T_{reg}$  lymfocytů) slizniční B-lymfocyty k produkci sekrečního IgA, IL-10 a TGF- $\beta$  (Garrett et al., 2010). Naproti tomu prozánětlivá složka imunitní odpovědi navozená dysbiózou a patogenními agens je charakterizována produkcí IL-12.

Vývoj intestinální homeostázy, ve které má své nezastupitelné místo také imunitní systém, začíná již během raného postnatálního vývoje, kdy je organismus kolonizován komenzální mikrobiotou. Kolonizace mukózních povrchů mikrobiotou v tomto období

ontogeneze má zásadní význam pro rozvoj funkční imunity, a to nejen slizniční, nýbrž i systémové.

Integrita a kvalita epitelové vrstvy tenkého střeva je přímo zodpovědná za intestinální bariérovou funkci. Kontakt mezi dvěma sousedním enterocyty je zajišťován luminálně lokalizovanými buněčnými spojeními označovanými jako „tight junctions“ a bazálně lokalizovanými „adherens junctions“ a desmosomy. Epitelové tight junctions představují multimolekulární proteinový komplex složený z membránových proteinů zahrnujících okludiny, proteiny rodiny claudinů, ZO-proteiny, myosin IXB, zonulin a junkční adhezí molekuly. Proteiny tight junctions formují fibrilární struktury tvořené molekulami okludinu a claudinu, procházejí membránami sousedních enterocytů, čímž zajišťují vzájemnou interakci těchto buněk. Okludiny a claudiny jsou vzájemně spojeny s intracelulárními proteiny ZO-1, ZO-2 a ZO-3 aktinovými filamenty, jejichž organizace reguluje paracelulární propustnost sliznice tenkého střeva. Tight junctions jsou dynamickými a přísně regulovanými strukturami, které relaxují či kontrahují v odpovědi na stimuly přicházející z lumen střeva, z epitelu či z lamina propria mucosae. Mezi stimuly ovlivňující propustnost střeva skrze tight junctions patří dietní produkty či jejich metabolity, humorální nebo neuronální signály, zánětlivé mediátory, produkty žírných buněk či působky patogenních virových a bakteriálních agens (Turner, 2009). Důležitým patofyziologickým mechanismem (využívaným např. i řadou bakterií), který reguluje propustnost tenkého střeva prostřednictvím tight junctions, je exprese zonulinu. Zonulin je parakrinně secernován z buněk lamina propria mucosae na povrch střevní sliznice, kde se váže na zonulinový receptor enterocytů, ve kterých indukuje snížení exprese ZO-1 a okludinu a restrukturalizaci cytoskeletu vedoucí k otevření tight junctions a tím ke zvýšení střevní permeability (Wang et al., 2000; Groschwitz a Hogan, 2009; Fasano, 2012a, 2012b).

### **2.1.1. Intestinální permeabilita**

Základní funkcí enterocytů je absorpce molekul tráveniny. Absorpční schopnost střeva je umožněna jednak transcelulárním transportem, který může být pasivní (difúzní) či aktivní - využívající molekulárních přenašečů; dále pak transportem přes paracelulární prostory, který probíhá pasivní difúzí. Permeabilita střevní bariéry úzce souvisí s funkcí tight

junctions, které mají zásadní roli v regulaci paracelulárního transportu (Arrieta et al., 2006; Anderson a Van Itallie, 2009).

Zvýšená střevní permeabilita, často označovaná jako „leaky gut“, je nalézána u řady střevních, jaterních a autoimunitních chorob a rovněž u diabetes mellitus 1. a 2. typu. Doposud však není zcela jasné, zda poškození střevní bariéry doprovázené zvýšením střevní permeability je důsledkem či jednou z příčin těchto onemocnění. Na základě systematických pozorování však narůstají důkazy podporující představu o primárním vlivu poruchy střevní bariéry na rozvoj zmíněných onemocnění (Arrieta et al., 2006). Nepřímým důkazem působení alterované střevní bariéry na rozvoj autoimunitních a imunitně mediovaných onemocnění trávicího traktu je např. nález zvýšené střevní propustnosti u klinicky zdravých příbuzných prvního stupně pacientů s nespecifickými střevními záněty a celiakií (Groschwitz a Hogan, 2009). Předpokládá se, že porušení bariérové funkce střeva nadměrně stimuluje imunitní systém potravinovými a mikrobiálními antigeny z lumen střeva. Nadměrně stimulovaný imunitní systém může vést ke vzniku destruktivních procesů autoimunitní povahy.

### **2.1.2. Intestinální mikrobiota**

Střevní mikrobiota je důležitým faktorem spojujícím genetické pozadí, enviromentální vlivy a imunitní systém. Střevo průměrného zdravého člověka obsahuje více než  $10^{14}$  bakterií zahrnujících přibližně 1000 druhů (Neish, 2009). Množství bakterií progresivně narůstá v tenkém střevě aborálním směrem: od přibližného množství  $10^4$  bakterií na gram luminálního obsahu v jejunu až k  $10^7$  bakterií na gram luminálního obsahu v ileu, s predominancí gram-negativních aerobů a několika obligátních anaerobů. Největší množství bakterií je v tlustém střevě –  $10^{12}$  na gram luminálního obsahu (Zoetendal et al., 2006). Velikost genomu tohoto mikrobiálního společenství - mikrobiomu - převyšuje lidský nukleární genom o dva řády. Symbiotická mikrobiota umožňuje organismu některé důležité fyziologické funkce metabolické i imunologické (Musso et al., 2010).

Přítomnost komenzální intestinální mikrobioty je nutná v raných ontogenetických fázích organismu, kdy se podílí na regulaci trávení, růstu, angiogeneze a v neposlední řadě na maturaci imunitního systému (Hooper, 2004; Mazmanian et al., 2005). Dietní faktory, zejména v časném dětství (kdy dietou přicházejí do organismu doposud neznámé potravní antigeny), jsou zásadní pro ustavení ekvilibria intestinální mikrobioty (Penders et al., 2006).

Intestinální mikrobiota zpětně ovlivňuje stav a maturaci imunitního systému a regulaci permeability tenkého střeva. Přítomnost příznivé komenzální mikrobioty má i přímý imunomodulační efekt, neboť úzce souvisí s aktivitou cytotoxických a regulačních T-lymfocytů ( $T_{reg}$ ) ve střevní sliznici. Komenzální mikrobiota stimuluje vznik  $T_H3$  a  $T_{reg}$  lymfocytů produkujících IL-10 a TGF- $\beta$  tlumící prozánětlivé procesy (Yan a Polk, 2004; Rook a Brunet, 2005; Hrnčíř et al., 2008; Coombes a Powrie, 2008) a potlačujících rekreci prozánětlivého IL-17 (Ivanov et al., 2009).

Kolonizace zažívacího traktu bakteriemi může podporovat rozvoj orální tolerance (tj. imunologické neodpovídavosti na určité antigeny, zejména antigeny komenzální mikrobioty a potravní antigeny), jak bylo experimentálně prokázáno na zvířecích modelech (Sudo et al., 1997; Repa et al., 2008; Tsuda et al., 2010). Dále se ukazuje, že komenzální bakterie přímo ovlivňují integritu střevní bariéry: např. *Lactobacillus plantarum* prokazatelně zvyšuje expresi proteinů tight junctions okcludinu a ZO-1 v bioptických vzorcích tenkého střeva zdravých lidských dobrovolníků, čímž dochází ke snížení permeability tenkého střeva cestou tight junctions (Karczewski et al., 2010). Zvyšují se znalosti o úloze střevní mikrobioty nejen v rozvoji optimální funkce slizničního imunitního systému a intestinální bariéry, ale i o účasti mikrobiálních částic se silnými imunoaktivačními vlastnostmi (tj. lipopolysacharidu, peptidoglykanů, superantigenů, bakteriální DNA, heat shock proteinů) v etiopatogenetických mechanismech multifaktoriálních a multigenetických zánětlivých a autoimunitních onemocnění (jakými jsou např. nespecifické střevní záněty, celiakie, diabetes mellitus 1. typu, obezita, diabetes mellitus 2. typu, kardiovaskulární onemocnění, ateroskleróza, revmatologická, neurologická a psychiatrická onemocnění, alergie), ale i nádorových onemocnění (Tlaskalová-Hogenová et al., 2004; Tlaskalová-Hogenová et al., 2011; Kverka a Tlaskalová-Hogenová, 2013).

Střevní mikrobiota je v současnosti považována za lidský mikrobiální orgán, který hraje důležitou roli v imunitě a energetickém metabolismu. Možnost, že příčinou řady imunitně mediovaných či metabolických onemocnění může být alespoň částečně dysfunkce tohoto mikrobiálního orgánu, vede k rozsáhlému studiu vlivu transplantace fekální mikrobioty u těchto chorob (např. metabolický syndrom a diabetes mellitus 2. typu, idiopatické střevní záněty, syndrom dráždivého tračníku či autoimunitní a alergická onemocnění) (Borody a Khoruts, 2012).



## 2.2. Diabetes mellitus 1. typu a intestinální bariéra

Podstatou diabetes mellitus 1. typu (T1D) je imunitně mediovaná destrukce beta buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu (autoimunitní inzulinitída), čímž postupně ustává sekrece inzulínu a zvyšuje se plasmatická hladina glykémie. Rozvoj diabetes mellitus 1. typu je indukován spouštěcími (environmentálními) vlivy u geneticky vnímavých jedinců (Yeung et al., 2011; Honeyman et al., 2010). Destruktivní imunitní proces zahrnuje jak složku vrozené, tak adaptivní imunity; Langerhansovy ostrůvky jsou během autoimunitní inzulinitídy infiltrovány monocyty, makrofágy, T- a B- lymfocyty (Beyan et al., 2006). O účasti složek adaptivní imunity svědčí skutečnost, že v průběhu autoimunitní inzulinitídy je v séru pacientů nalézána řada autoprotilátek: proti pankreatickým ostrůvkům (ICA, islet cell antibodies), proti dexarboxyláze kyseliny glutamové (GADA, glutamic acid dexarboxylase antibodies), anti-IA2 protilátky (islet antigen-2 antibodies), proti inzulínu (IAA, insulin auto-antibodies). Podle současných představ jsou beta buňky pankreatu poškozovány T-buněčně mediovanými imunitní mechanismy. Destrukce beta buněk se přímo účastní cytotoxické CD8+T-lymfocyty v kontextu zánětlivého prostředí determinovaného produkcí cytokinů IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  a IL-17, které patrně i samo indukuje apoptózu beta buněk (Honkanen et al., 2010; Arif et al., 2011).

Studie na zvířecích modelech diabetes mellitus 1. typu prokázaly imunitní spojení onemocnění pankreatu a tenkého střeva. T-buňky aktivované v gastrointestinálním traktu migrují do Langerhansových ostrůvků, jejichž buňky exprimují mukózní „homing“ receptor MadCAM-1 (Hanninen et al., 2007). Anatomické a imunitní spojení obou orgánů umožňuje transfer antigenů z lumen tenkého střeva do sekundárních lymfatických orgánů pankreatu. Na transgenním myším modelu bylo např. demonstrováno, že potravní ovalbumin indukuje proliferaci T-buněk (s přítomným ovalbumin-specifickým T-buněčným receptorem) jak v mezenterálních, tak i pankreatických lymfatických uzlinách (Turley et al., 2005). Tato pozorování naznačují, že potravní (a mikrobiální) antigeny nacházející se v lumen střeva mohou ovlivňovat imunitní buňky v pankreatu. Změny v zastoupení cytokinů ve střevní sliznici (které jsou výsledkem gastrointestinální infekce či alterované reakce imunitních buněk na intestinální mikrobiotu či potravní antigeny) indukují změny ve fenotypu a aktivitě T-lymfocytů. T-lymfocyty následně migrují z tenkého střeva do pankreatu, kde se mohou

podílet na rozvoji ostrůvkové autoimunity. Zmíněná představa imunitního spojení mezi střevem a pankreatem koresponduje s embryonálním původem pankreatu, který se vyvíjí ze střevního endodermu (Vaarala, 2012).

Vaarala et al. definovali hypotézu, podle níž intestinální dysbióza, porucha slizniční střevní bariéry a aberantní intestinální imunitní reakce jsou příčinou vzniku diabetes mellitus 1. typu. Střevní mikrobiota, střevní propustnost a střevní imunita jsou tři vzájemně provázané, a tedy vzájemně se ovlivňující systémy (Vaarala et al., 2008).

## **2.2.1. Diabetes mellitus 1. typu a intestinální mikrobiota**

### **2.2.1.1. Intestinální mikrobiota u zvířecích modelů autoimunitního diabetes mellitus**

Výsledky pokusů na zvířecích modelech (včetně bezmikrobních) diabetes mellitus 1. typu, NOD myších (non-obese diabetic mice) a BB-DP potkanech (biobreeding diabetes prone rats) ukazují, že změny v mikrobiotě ovlivňují rozvoj autoimunitního diabetes mellitus.

Zdá se, že existuje určitá intestinální mikrobiota s projektivním efektem na rozvoj autoimunitního diabetes (anti-diabetogenní mikrobiota) (Roesch et al., 2009): NOD myši chované v bezmikrobních podmínkách vyvinou diabetes mellitus častěji, než myši chované v konvenčních podmínkách (Greiner et al., 2001; Mordes et al., 2004; Wen et al., 2008), stejně tak BB-DP potkani narození císařským řezem (asepticky) vykazují akcelerovaný vývoj diabetes mellitus (Like et al., 1991). Transfer fekální mikrobioty od diabetes-rezistentních potkanů (BB-DR rats) či podání *Lactobacillus spp.* zmírňuje u bezmikrobních BB-DP potkanů rozvoj autoimunitního diabetes (Valladares et al., 2010).

Oproti tomu podávání antibiotik (doxycyklinu, kyseliny fusidové, kolistinu či bactrimu) BB-DP potkanům v odstavu má protektivní účinek před rozvojem diabetu, což naznačuje existenci pro-diabetogenní mikrobioty (Buschard et al., 1992; Brugman et al., 2006; Schwartz et al., 2007). NOD myši také vyvíjejí T-buněčnou odpověď proti zástupcům komenzální mikrobioty (Alam et al., 2010).

Kvalita interakcí mikrobioty a složek přirozené imunity v tenkém střevě pravděpodobně rozhoduje o rozvoji poškozující adaptivní imunitní reakce proti beta buňkám pankreatu. Pochopení zákonitostí interakce mikrobioty a imunitního systému by poskytovalo

i budoucí možnosti ochrany před vznikem autoimunitního diabetes mellitus pomocí modulace složení střevní mikrobioty (Lau et al., 2011).

#### **2.2.1.2. Intestinální mikrobiota u pacientů s diabetes mellitus 1. typu**

Úloha střevní mikrobioty ve vývoji diabetes mellitus 1. typu u lidí je předmětem intenzivního výzkumu. V pilotní studii autorů Giongo et al. (2011) byly popsány změny mikrobioty u dětí, které vyvinuly beta buněčnou autoimunitu. Ukazuje se, že mikrobiota u dětí s beta buněčnou autoimunitou je méně druhově rozmanitá. Zajímavé je, že druhová šíře bakteriální kolonizace se snižuje s délkou času, po kterou jedinec trpí autoimunitou ve srovnání s jedinci, u kterých nebyla autoimunita prokázána. U dětí s diabetes mellitus 1. typu bylo (ve srovnání se zdravými dětmi) popsáno odlišné složení střevní mikrobioty: snížené zastoupení bifidobakterií, kmenů *Lactobacillus* a *Firmicutes* a naopak zvýšené zastoupení clostridií, enterobakterií, *Candida albicans* a *Bacteroides* (Murri et al., 2013; Soyucen et al., 2014).

Narůstající incidence diabetes mellitus 1. typu by pak mohla být z části vysvětlena změnami v mikrobiotě jako důsledku změn hygienických a potravinových standardů a životního stylu pozorovaných v posledních dekadách (Vaarala, 2012).

#### **2.2.2. Diabetes mellitus 1. typu a intestinální permeabilita**

##### **2.2.2.1. Intestinální permeabilita u zvířecích modelů autoimunitního diabetes mellitus**

U animálních modelů autoimunitního diabetes mellitus (BB-DP potkanů i NOD myší) byla prokázána zvýšená intestinální permeabilita již v prediabetických stadiích (Visser et al., 2010; Lee et al., 2010). Zvýšená intestinální permeabilita signifikantně pozitivně korelovala s nálezem snížené exprese claudinu 1 a okcludinu (proteinů tight junctions mezi enterocyty). Detailnější analýzy prokázaly, že zvýšená intestinální permeabilita byla charakteristická pro všechna stadia diabetes včetně prediabetických, kde byla překvapivě nejvyšší (Meddings et al., 1999; Neu et al., 2005). S těmito výsledky koresponují nálezy jak zvýšené intraluminální koncentrace zonulinu v preklinických stadiích diabetes, tak i vliv orálního podání inhibitoru

zonulinu AT-1001 (snižuje střevní permeabilitu), který současně snižoval incidenci diabetes (Watts et al., 2005).

Přestože zvýšení střevní permeability je jasně spojeno s rozvojem autoimunitního diabetes mellitus u zvířecích modelů, pro plný rozvoj tohoto onemocnění je patně nutná přítomnost střevního zánětu. Představu přítomnosti střevního zánětu v prediabetickém stadiu autoimunitního diabetes mellitus podporuje např. nález zvýšené aktivity myeloperoxidázy ve sliznici tenkého střeva u BB-DP potkanů (Meddings et al., 1999; Graham et al., 2004; Neu et al., 2005).

#### **2.2.2.2. Intestinální permeabilita u pacientů s diabetes mellitus 1. typu**

Podobně jako u zvířecích modelů je také u pacientů s diabetes mellitus 1. typu nalézána zvýšená střevní permeabilita (měřená testem laktulóza/manitol), jež pozitivně koreluje s lumenální koncentrací zonulinu. Zvýšená urinární exkrece laktulózy, nikoliv však manitolu, znamená dominanci zvýšení paracelulární střevní permeability. Bylo ukázáno, že zvýšená střevní permeabilita však u pacientů nekoreluje s délkou trvání diabetu a ani s hladinou HbA1c (Kuitunen et al., 2002; Secondulfo et al., 2004; Sapone et al., 2006). Signifikantně zvýšené sérové hladiny zonulinu byly prokázány nejen u pacientů s diabetes mellitus 1. typu, nýbrž také u 70 % jejich příbuzných séropozitivních v protilátkách proti ostrůvkům pankreatu, tedy u jedinců v prediabetických stádiích (Sapone et al., 2006). Naproti tomu například Bosi et al. (2006) nepozorovali žádný rozdíl ve střevní propustnosti (měřené testem laktulóza/manitol) mezi skupinou pacientů v preklinickém stadiu diabetu a pacientů s dlouhotrvajícím diabetem.

U latentního autoimunitního diabetes mellitus dospělých (LADA) nález přítomnosti anti-gliadinových protilátek naznačuje poruchu slizniční bariérové funkce, která může přispívat k beta buněčné autoimunitě (Kučera et al., 2003).

#### **2.2.2.3. Intestinální permeabilita a mikroskopické změny sliznice tenkého střeva u pacientů s diabetes mellitus 1. typu**

Elektron-mikroskopická vyšetření bioptických vzorků duodena od pacientů s diabetes mellitus 1. typu prokázala poškození tight junctions a rozšíření paracelulárních prostorů mezi

epitelovými buňkami, což vysvětluje zvýšenou střevní propustnost, ale zároveň naznačuje přítomnost jakéhosi subklinického intestinálního zánětu. Analogické změny sliznice tenkého střeva byly nalezeny u zvířecích modelů autoimunitního diabetes mellitus. Oproti tomu histologická analýza biopsií tenkého střeva u pacientů s diabetes mellitus 1. typu podobně jako u DP-BB potkanů neprokázala výrazné patologické změny duodena (Secondulfo et al., 2004). Na základě těchto pozorování se předpokládá, že pouze zvýšená střevní permeabilita patrně předchází vzniku diabetes mellitus 1. typu. Zvýšená střevní propustnost vede ke zvýšenému průniku lumenálních antigenů do subepitelových prostorů střeva a k antigenní stimulaci imunitních buněk a sekundárně také ke genotypové a fenotypové alteraci enterocytů a jejich zapojení v intestinální zánětlivé reakci, která je v subklinické formě nalézána u pacientů s diabetes mellitus 1. typu (Bosi et al., 2006). Uvedené nálezy spíše podporují hypotézu o kauzálním zapojení zvýšené intestinální permeability v patogenezi diabetes mellitus 1. typu (Kort et al., 2011).

### **2.2.3. Alterace slizničního imunitního systému u diabetes mellitus 1. typu**

#### **2.2.3.1. Aktivace intestinální imunity u diabetes mellitus 1. typu**

Řada studií dokumentuje v tenkém střevě modelových zvířat i pacientů s diabetes mellitus 1. typu změny slizničního imunitního systému, které provázejí zvýšenou permeabilitu tenkého střeva. Analýzy enterobiopsií pacientů s diabetes mellitus 1. typu ukázaly přítomnost zánětlivých cytokinů (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-4) ve sliznici tenkého střeva se současně zvýšenou permeabilitou střeva (Westerholm-Ormio et al., 2003; Bruewer et al., 2005; Li et al., 2008; Vaarala, 2008), zvýšenou expresi HLA-DR a HLA-DP antigenů II. třídy a zvýšení exprese intercelulární adhezní molekuly ICAM-1 na enterocytech (Westerholm-Ormio et al., 2003) a zvýšenou expresi  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 integrinu na imunitních buňkách lamina propria mucosae (Savilahti et al., 1999). Tyto nálezy ukazují, že v tenkém střevě pacientů s diabetes mellitus 1. typu je přítomen určitý subklinický zánět, provázený sekrecí zánětlivých cytokinů typu Th1.

Kultivace gliadinu s bioptickými vzorky sliznice tenkého střeva pacientů s diabetes mellitus 1. typu vede ke zvýšené expresi IL-4, IL-1 $\alpha$  a IFN- $\gamma$  a zvýšení četnosti CD25+ buněk

v lamina propria mucosae a intraepiteliálních CD3+  $\gamma/\delta$  intraepiteliálních T-lymfocytů (Auricchio et al., 2004). Popsané změny ve střevní sliznici se neomezují pouze na pacienty exprimující některou z alel HLA-DQ2 (která je asociována s celiakií) a nemohou být tedy způsobeny ev. latentní celiakií. Enterobiopsické nálezy u dětí s diabetes mellitus 1. typu se liší od dětí s aktivní celiakií nejen morfologickými změnami, nýbrž i nízkou přítomností regulačních Foxp3+ T-lymfocytů (Tiittanen et al., 2008; Badami et al., 2011).

### **2.2.3.2. Autoimunitní reakce proti beta buňkám jako důsledek reaktivity proti potravinovým a bakteriálním antigenům**

Zvýšená intestinální permeabilita a chronický či rekurentní intestinální zánět jsou rizikovými faktory pro vznik rozvinuté imunitní reakce proti antigenům nacházejícím se v lumen střeva. Potravinové antigeny, antigeny mikrobioty i mrtvých buněk trávicího traktu přítomné v chymu mohou za nepříznivých podmínek aktivovat aberantní imunitní odpověď v tenkém střevě včetně reaktivece efektorových autoimunitních T- a B- buněčných klonů, jež migrují do lymfatické tkáně lokalizované v pankreatu a vyvolávají autoimunitní reakci proti beta buňkám, jak ukazují výsledky z experimentálních zvířecích modelů. Řada prací prokazuje souvislosti mezi dietními antigeny a rozvojem inzulinítydy. Autoimunitní inzulinítyda může být tedy důsledkem porušení mechanismů orální tolerance spojené se zvýšenou intestinální permeabilitou u geneticky predisponovaných jedinců (Tiittanen et al., 2006; Kort et al., 2011). Zcela běžné potravinové antigeny, jakými jsou gliadin a proteiny kravského mléka, mohou vyvolat aktivaci intestinální imunity (Vaarala et al., 1996; Klemetti et al., 1998).

#### **2.2.3.2.1. Gliadin a diabetes mellitus 1. typu**

Celiakie (trvalá, imunologicky mediovaná glutenová intolerance charakteristická morfologickým a funkčním poškozením tenkého střeva) a diabetes mellitus 1. typu jsou asociovaná onemocnění s významnou vazbou na geny kódované lokusem MHC, zejména HLA-DQ2 a DQ8. Koincidence celiakie a diabetes mellitus 1. typu se pohybuje mezi 1 a 11 % (Marchese et al., 2013). Studium spojitostí mezi vznikem diabetes mellitus 1. typu a gliadinem se proto stalo předmětem intenzivního zájmu. Dlouhodobé nedodržování bezpečkové diety u pacientů s diagnostikovanou celiakií zvyšuje riziko rozvoje asociovaných autoimunitních chorob včetně diabetes mellitus 1. typu (Ventura et al., 1999).

Absence gliadinu snižuje incidenci autoimunitního diabetes mellitus v obou zvířecích modelech, tedy jak u BB-DP potkanů (Elliott a Martin, 1984; Visser et al., 2010), tak u NOD-myší (Funda et al., 1999). Snižování incidence autoimunitního diabetes u experimentálních zvířat je spojena se snížením intestinální permeability, sérové hladiny zonulinu a se zvýšením exprese proteinů tight junctions. Absence gliadinu tedy může mít protektivní efekt na integritu intestinální bariéry (Visser et al., 2010). Funda et al. (2008) precizněji definovali vztah dietárního gliadinu k indukci diabetes u NOD myší: časné zavedení potravy obohacené jen malým množstvím gliadinu totiž může mít tentýž protektivní efekt před rozvojem diabetes jako bezlepková dieta. Gliadin podávaný tímto způsobem pravděpodobně indukuje modulaci reaktivity slizničního imunitního systému a navození orální tolerance proti tomuto proteinu, ale pravděpodobně také proti jiným složkám potravy a mikrobioty. Součástí těchto jevů bude patrně také ochrana integrity střevní sliznice.

Oproti situaci v experimentálním zvířecím modelu časná expozice potravnímu gliadinu v dětství zvyšuje podle některých studií u lidí riziko vzniku chronického intestinálního zánětu a rozvoje beta buněčné autoimunitní reakce a diabetes mellitus 1. typu (Scott et al., 2002; Ziegler et al., 2003; Norris et al., 2003; Auricchio et al., 2004; Knip et al., 2010). Avšak eliminace gliadinu při již probíhající ostrůvkové autoimunitě (charakterizované séropozitivitou ostrůvkových autoprotilátek) není schopná zastavit již započatý autoimunitní proces proti beta buňkám Langerhansových ostrůvků (Hummel et al., 2002; Pastore et al., 2003). Aplikace bezlepkové diety v tomto období může pouze zvýšit inzulínovou sekreci a senzitivitu (Pastore et al., 2003). Přestože mechanismus, kterým bezlepková dieta zlepšuje inzulínovou sekreci a senzitivitu je nejasný (glykemický index bezlepkové diety je podobný jako u běžné diety), protektivní vliv odnětí gliadinu na funkci beta buněk pankreatu během preklinické fáze diabetes mellitus 1. typu a tedy i opoždění klinické manifestace diabetu jsou prokazatelné (Packer et al., 2000).

Od devadesátých let 20. století probíhají intenzivní studie genetického pozadí diabetes mellitus 1. typu a celiakie ve vztahu ke zvýšené střevní propustnosti. V rámci těchto studií byl např. identifikován gen MYO9B, jenž se účastní kontroly střevní propustnosti. Polymorfismus v genu MYO9B je asociován jak se zvýšenou vnímavostí k celiakii, tak k diabetes mellitus 1. typu (Monstuur et al., 2005; Santiago et al., 2008).

### **2.2.3.2.2. Proteiny kravského mléka, bovinní inzulín a diabetes mellitus 1. typu**

U dětí vyživovaných dietou odvozenou z kravského mléka byla prokázána (oproti dětem kojeným) zvýšená střevní propustnost (Catassi et al., 1995), která pravděpodobně souvisí s intestinálním zánětem, charakterizovaným zvýšenou sérovou hladinou solubilního ICAM-1 (Paronen et al., 1996). Vyloučením kravského mléka z potravy dochází ke změnám ve složení intestinální mikrobioty, potlačení zánětu a obnovení orální tolerance (Vaarala et al., 1999).

Vyloučením proteinů kravského mléka ze stravy je současně eliminován také v mléku přítomný bovinní inzulín, který se zdá být (podle experimentů na zvířecích modelech) induktorem ostrůvkové autoimunity. Bovinní inzulín senzitivuje v časných obdobích života intestinální T-lymfocyty, které se po reaktivaci v průběhu života mohou podílet na vzniku autoimunitní inzulinidie (Vaarala, 2006). Příjem vysokých dávek bovinního inzulínu v časně dietě u dětí s genetickým rizikem diabetes mellitus 1. typu je spojen se vznikem beta buněčné autoimunity (Tiittanen et al., 2006). Zvýšená hladina protilátek proti kravskému mléku v časném dětství je prokazována u jedinců, kteří později během dětství vyvinou diabetes mellitus 1. typu (Luopajarvi et al., 2008). Vaarala et al. (2012) předpokládají, že vynechání produktů kravského mléka v potravě v prvních měsících života umožňuje optimální rozvoj orální tolerance a prevenci vzniku beta buněčné autoimunity.

Omezení doby kojení může způsobit opoždění ve vývoji a nástupu funkce tenkého střeva v ontogeneze, neboť biologicky aktivní látky mateřského mléka napomáhají funkčnímu rozvoji střevního epitelu, střevní bariéry a slizničního imunitního systému včetně sekrece slizničního IgA (Catassi et al., 1995; Piirainen et al., 2009). Epidemilogické studie u lidí potvrzují rizikovost krátké doby kojení a časného zavedení výživy obsahující proteiny kravského mléka pro vznik diabetes mellitus 1. typu (Vaarala, 2008; Vaarala et al., 2008). Při substituci kravského mléka v dietě hydrolyzovaným kaseinem v časném dětství dochází k poklesu rizika vzniku inzulinidie u dětí s genetickou predispozicí k diabetes mellitus 1. typu přibližně o 50 % (Akerblom et al., 2005). Výsledky studie TRIGR zahrnující sledování dětí do věku 10- ti let prokázaly, že podávání diety obsahující hydrolyzovaný kasein po ukončení kojení snižuje riziko beta buněčné autoimunity u dětí s genetickým rizikem rozvoje diabetu mellitu 1. typu o 40 % (Knip et al., 2010). Intervenční studie FINDIA prokázala, že podávání stravy využívající syrovátky kravského mléka a vyloučení bovinního inzulínu v prvních 6- ti



měsících života snižuje výskyt beta buněčných autoprotilátek u tříletých dětí (Vaarala et al., 2012).

#### **2.2.3.2.3. Vliv enterální infekce při rozvoji diabetes mellitus 1. typu**

Podle některých studií jsou enterální infekce způsobené rotaviry a enteroviry považovány za možné induktory diabetes mellitus 1. typu u lidí (Lönnrot et al., 2000; Honeyman et al., 2000; Honeyman et al., 2010; Yeung et al., 2011). V beta buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu u pacientů s diabetes mellitus 1. typu byla prokázána přítomnost enterovirových antigenů (Ylipaasto et al., 2004; Richardson et al., 2009). Enterovirový protein VP1 a enterovirová RNA byly nalezeny v biopsiích tenkého střeva pacientů s diabetes mellitus 1. typu častěji než u zdravých jedinců (Oikarinen et al., 2008). Přítomnost enterovirové RNA v krvi byla rovněž zjištěna u příbuzných pacientů s diabetes mellitus 1. typu v průběhu 6- ti měsíční periody předcházející prvnímu záchytu séropozitivity ostrůvkových autoprotilátek (Oikarinen et al., 2011). Ve studii DAISY u dětí s přítomností séropozitivity ostrůvkových autoprotilátek korelovala hladina enterovirové RNA v séru signifikantně pozitivně s progresí diabetes mellitus 1. typu a jeho klinickou manifestací (Stene et al., 2010). U pacientů s diabetes mellitus 1. typu byla dokumentována křížová reaktivita T-lymfocytů, které rozpoznávají specifické epitopy rotavirového proteinu VP-7 a současně antigeny pankreatických ostrůvků IA-2 a GAD (Honeyman et al., 2010). U NOD myši a NOD 8.3 TCR myši (transgenní myši pro T-buněčný receptor specifický pro ostrůvkový autoantigen) akceleruje rotavirová infekce již probíhající inzulinítidu a urychluje klinickou manifestaci diabetes mellitus (Graham et al., 2008). Zajímavé je, že v tomto modelu nebyla infekce prokázána v pankreatu, ale v tenkém střevě, což podporuje domněnku, že enterální infekce mohou být iniciačním faktorem v rozvoji diabetes mellitus prostřednictvím aktivace slizniční imunity.

Dále u 4 týdnů starých NOD myši infikovaných *Citrobacterium rodentum*, které prokazatelně způsobuje poškození intestinální epitelové bariéry, je pozorováno zkrácení období od infektu po vznik autoimunitního diabetes mellitus. V průběhu infekce *Citrobacterium rodentum* byla nalezena v pankreatických lymfatických uzlinách polyklonální aktivace T lymfocytů včetně CD8+ (spojovaných s účastí na poškození beta buněk pankreatu) (Lee et al., 2010).

Zmíněná pozorování vedou k domněnce, že enterální infekce mohou způsobovat disrupci střevní epitelové bariéry, zvýšení intestinální propustnosti, hyperstimulaci intestinálního imunitního systému a aktivaci autoimunitního procesu v pankreatických lymfatických uzlinách a v pankreatu, a tak vést k rozvoji inzuliníty s následnou destrukcí beta buněk (Oikarinen et al., 2008; Lee et al., 2010).

Dokumentovaná spojitost mezi vznikem diabetes mellitus 1. typu a aktivací či dysregulací střevního slizničního systému následkem dysbiózy poskytuje nové směry pro prevenci a léčbu diabetes mellitus 1. typu, která by měla být cílena na modulaci střevního imunitního systému. Možností by mohlo být podávání hydrolyzované a bovinního inzulinu prosté výživy kojencům s genetickým rizikem vzniku diabetes mellitus 1. typu (Akerblom et al., 2005; Vaarala, 2012) či manipulace se střevní mikrobiotou (Kverka a Tlaskalová-Hogenová, 2013).

### **2.3. Diabetes mellitus 2. typu a intestinální bariéra**

Diabetes mellitus 2. typu je charakterizován inzulinovou rezistencí a relativním inzulinovým nedostatkem vedoucím k hyperglykémii a je téměř vždy spojen s obezitou či nadváhou. V jeho rozvoji se uplatňuje vysoce kalorická, vysokotuková dieta a sedavý způsob života (Kahn et al., 2006). Qatanani a Lazar (2007) definovali několik patofyziologických mechanismů, jimiž obezita může indukovat inzulinovou rezistenci, resp. diabetes mellitus 2. typu; jde o mechanismy endokrinní (mastné kyseliny, adipokiny), neuronální, celulárně metabolické (oxidativní stres, mitochondriální dysfunkce) a zánětlivé. Chronický subklinický („low-grade“) zánět je relativně novým konceptem v metabolické medicíně, vysvětlující vztah mezi zánětem, tukovou tkání, inzulinovou rezistencí, aterosklerózou a diabetem mellitem 2. typu (Anděl et al., 2009).

Tenké střevo se podílí na kontrole glukózové homeostázy sekrecí inkretinů (Drucker, 2007). Ve sliznici distální části tenkého střeva a kolon jsou distribuovány střevní endokrinní buňky (L buňky), produkující inkretiny, zejména glucagon-like peptid 1 (GLP-1) a glucose-dependent insulintropic polypeptid/gastric inhibitory polypeptid (GIP). Hlavními

mechanismy, kterými inkretiny ovlivňují homeostázu glukózy, jsou posílení sekrece inzulínu závislé na glykémii, postprandiální suprese sekrece glukagonu, ovlivnění evakuace žaludku a glukoneogeneze v tenkém střevě, která reguluje jaterní metabolismus glukózy. Vztah inkretinů k diabetes mellitus 2. typu je dokumentován řadou pozorování, např. jeho vymizením po provedení by-passu proximálního tenkého střeva u lidí (Rubino et al., 2010) či u myšího modelu diabetes mellitus 2. typu (Troy et al., 2008). V případě obezity a diabetes mellitus 2. typu je pozorována zvýšená systémová produkce prozánětlivých cytokinů (TNF- $\alpha$ , IL-12) a C-reaktivního proteinu. TNF- $\alpha$  a IL-12 mediují periferní inzulínovou rezistenci prostřednictvím signalizačních drah zahrnujících aktivaci NF- $\kappa$ B a JNK1 vedoucí k fosforylaci serinu inzulínového receptoru-1 (Hotamisligil a Erbay, 2008). Původním iniciátorem rozvoje chronického „low-grade“ zánětu vedoucího až k inzulínové rezistenci a diabetes mellitus 2. typu může být zvýšená intestinální permeabilita a intestinální dysbióza (Kort et al., 2011). Genetická predispozice, imunitní systém tenkého střeva, střevní mikrobiota, vlivy diety a prostředí představují komplexní systém zasahující do rozvoje obezity, inzulínové rezistence a diabetes mellitus 2. typu. V patogenezi těchto metabolických chorob se recentně dostávají do pozornosti složky přirozené imunity (Musso et al., 2010). Například se ukázalo, že myši krmené vysokotukovou dietou vyvíjejí hepatickou inzulínovou rezistenci a glukózovou intoleranci, která je mediována aktivovanými jaterními makrofágy. Potlačení aktivity jaterních makrofágů pak obnovuje hepatickou inzulínovou senzitivitu a snižuje akumulaci celotělového i hepatického tuku společně se zlepšením glukózového metabolismu (Neyrinck et al., 2009; Huang et al., 2010).

Experimenty na zvířecích modelech obezity dokazují přímou souvislost mezi změnami složení mikrobioty a rozvojem obezity, inzulínové rezistence a diabetes mellitus. Stav a složení intestinální mikrobioty ovlivňuje: (1) sekreci střevních peptidů: střevního peptidu YY, GLP-1 a GLP-2, (2) metabolismus a složení mastných kyselin v tukové tkáni a játrech, (3) energetické využití potravy a (4) chronický „low grade“ zánět. Chronický „low grade“ zánět pravděpodobně souvisí s „low-grade“ endotoxémií, jež je považována za klíčový faktor vzniku mnoha metabolických onemocnění (Musso et al., 2010).

### 2.3.1. Chronická „low-grade“ endotoxémie u diabetes mellitus 2. typu

Výsledky studií analyzujících vztah mezi složením diety, intestinální mikrobiotou, epitelovou integritou a obezitou zdůraznily klíčový význam intestinálních mikroorganismů a jejich strukturálních komponent (zejména bakteriálního lipopolysacharidu) v rozvoji metabolických onemocnění spojených s obezitou a diabetes mellitus 2. typu (Diamant et al., 2011; Gregor a Hotamisligil, 2011). Bakteriální lipopolysacharid (LPS), někdy nazývaný endotoxin, je součástí stěny gram-negativních bakterií a je jedním z nejsilnějších zánětlivých signálů. LPS je mimořádně všudypřítomný v přírodě, vyskytuje se v potravě, ve vodě, v běžném domácím prostředí, včetně domácího prachu (Fernández-Real et al., 2011). Endogenní LPS je rovněž kontinuálně produkován ve střevním lumen při replikaci nebo zániku gram-negativních bakterií a je ze střevního lumen absorbován do intestinálních kapilár. Mírná („low-grade“) koncentrace LPS v portální krvi člověka je zcela normálním stavem (Jacob et al., 1977).

V plazmě pacientů s diabetes mellitus 2. typu byly nalezeny statisticky signifikantně zvýšené hladiny LPS ve srovnání s kontrolní skupinou krevních dárců (Creely et al., 2007). Vysokotuková a vysokokalorická dieta vede ke kolonizaci střeva gram-negativní mikrobiotou a následně ke zvýšené plasmatické hladině LPS v experimentálních zvířecích modelech i u lidí (Cani et al., 2007a; Amar et al., 2008). Takovéto mírné zvýšení hladiny LPS v plazmě je označováno jako metabolická endotoxémie či „low-grade“ endotoxémie. Plasmatické koncentrace LPS během metabolické endotoxémie jsou relativně nízké a nedosahují extrémních hladin nalézáných během akutní endotoxémie u septického šoku (Cani et al., 2007a). Gram-negativní střevní bakterie mohou prostřednictvím LPS iniciovat zánět. LPS je transportován ze střevního lumen do cílových tkání chylomikrony, jež jsou syntetizovány enterocyty v odpovědi na vysokotukovou dietu (Cani et al., 2009b). LPS se váže na receptorový komplex CD14/TLR4/MD2 exprimovaný na povrchu buněk systému přirozené imunity, zejména monocytů, makrofágů či neutrofilů. Vazba LPS na CD14/TLR4/MD2 spouští soubor buněčných změn vedoucích přes aktivaci NF- $\kappa$ B k sekreci prozánětlivých cytokinů (např. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 a C-reaktivního proteinu), které za nepříznivých okolností mohou vyvolat inzulínovou rezistenci, obezitu a diabetes mellitus 2. typu (Cani et al., 2007a). V myším modelu s chybějícím receptorem TLR4 (TLR4 knock-out) nedochází k rozvoji

inzulínové rezistence indukovatelné vysokotukovou dietou (Shi et al., 2006). Metabolická endotoxémie experimentálně navozená subkutánním podáním LPS myším způsobila stejné metabolické abnormality, jaké byly vyvolány vysokotukovou dietou. Potvrzením těchto nálezů byla rezistence myši s chybějícím receptorem CD14 (CD14 knock-out) jak k efektu vysokotukové diety, tak i k podání LPS. Překvapivým zjištěním byla hypersenzitivita těchto CD14 knock-out myši k inzulinu i při příjmu konvenční potravy. Inzulínová senzitivita se tedy zdá být fyziologicky modulována prostřednictvím molekuly CD14 (Cani et al., 2007a).

Dále bylo ukázáno, že změny ve složení střevní mikrobioty vyvolané antibiotickou léčbou zredukovaly v myším modelu metabolickou endotoxémii a cékální obsah LPS (Cani et al., 2008a). Vliv bakteriálního LPS na vyvolání systémového zánětu byl studován také u zdravých lidí. Výsledky studie Andersona et al. (2007) prokázaly (podobně jako předchozí studie na zvířecích modelech) asociaci mezi stupněm endotoxémie a hladinami adipózního TNF- $\alpha$ , IL-6 a inzulinovou rezistencí. Vysokotuková a vysokouhlovodanová dieta navodila signifikantní zvýšení postprandiální plasmatické hladiny LPS, které bylo spojené se zvýšením exprese receptoru TLR4 na mononukleárních buňkách a se zvýšením exprese NF- $\kappa$ B a adipokinu SOCS-3, jež přispívají k inzulinové rezistenci.

Role bakteriálního LPS a aktivace receptorového komplexu CD14/TLR4/MD2 svědčí o účasti složek přirozené imunity v patogenezi diabetes mellitus 2. typu (Jialal et al., 2014a).

### **2.3.2. Ovlivnění střevní mikrobioty antibiotiky, prebiotiky, probiotiky a fekální transplantací u diabetes mellitus 2. typu**

Důležitost střevní mikrobioty v rozvoji diabetes mellitus 2. typu dokládají i studie analyzující vliv podávání prebiotik, probiotik a antibiotik. Jako probiotika jsou označovány živé bakterie podávané orálně v množstvích umožňující kolonizaci. Prebiotika jsou biologicky účinné látky, které nejsou degradovatelné enzymatickým aparátem hostitelského organismu (př. oligosacharidy, inulin), avšak jsou štěpitelné kolonickou mikrobiotou a stimulují růst symbiotických bakterií, jakými jsou *Bifidobacterium* a *Lactobacillus spp.* (Musso et al., 2010). Výsledky studií na zvířecích modelech prokázaly, že aplikace prebiotik a probiotik zvyšuje zastoupení bifidobakterií a redukuje množství LPS ve střevě, zlepšuje bariérovou funkci

střeva včetně zvýšené exprese proteinů tight junctions ZO-1 a okludinu (Cani a Delzenne, 2007; Cani et al., 2007c; Cani et al., 2008b; Zákostelská et al., 2011). Bifidobakteria nedegradují (na rozdíl od jiných patogenních gram-negativních bakterií) intestinální glykoproteinovou hlenovou vrstvu, což vede k podpoře zdravého střevního mikroprostředí a k ochraně před zvýšenou permeabilitou a bakteriální translokací (Cani et al., 2007c). Zlepšení funkce tight junctions vede ke snížení translokace bakteriálního endotoxinu (LPS) do submukózy, a také ke snížení stimulace prozánětlivé imunitní odpovědi. Užívání prebiotik vyvolává příznivé morfologické změny ve střevní sliznici: zvýšení délky klků, prohloubení krypt a zesílení vrstvy hlenu v jejunu a v tlustém střevě (Kleessen et al., 2003).

Významnou úlohu při udržování integrity střevní bariéry mají deriváty kyseliny máselné – produkty fermentace nestrávených uhlovodanů, které mají trofický účinek na buňky střevní sliznice. Na myším modelu byl prokázán protektivní vliv butyrátů na rozvoj obezity spojené s inzulínovou rezistencí vyvolanou dietními faktory. Butyráty pravděpodobně stimulují energetický výdej ovlivněním mitochondriálních funkcí (Gao et al., 2009) a mají protizánětlivé efekty vyplývající z inhibice produkce NF- $\kappa$ B a INF $\gamma$  (Hamer et al., 2009).

Podávání prebiotik obézním osobám vede k úbytku hmotnosti, zvýšení hladiny orexigenního hormonu ghrelinu (inhibovaného postprandiálně), k indukci hormonu sytosti – peptidu YY, ke snížení kalorického využití potravy, zmírnění výkyvů glykémie a ke snížení postprandiální zánětlivé odpovědi (Parnell a Reimer, 2009; Nilsson et al., 2008).

Probiotika (*Lactobacillus rhamnosus* a *Bifidobacterium lactis*) podávaná od prvního trimestru gravidity také snížila incidenci gestačního diabetes mellitus a snížila riziko velkého plodu (Laitinen et al., 2009; Luoto et al., 2010).

Fekální transplantace od štíhlých dárců pacientům s metabolickým syndromem vedla po 6- ti týdnech ke zvýšení inzulínové senzitivity společně se zvýšením množství butyrát-produkující intestinální mikrobioty u příjemců (Vrieze et al., 2012).

### 2.3.3. Vliv nutrientů na sérovou hladinu lipopolysacharidu – úloha intestinální permeability

Zvýšená hladina plasmatického LPS může pocházet ze zvýšené produkce LPS střevní mikrobiotou a/nebo ze zvýšené střevní absorpce LPS. Různé nutrienty mají rozdílný vliv jak na produkci mikrobiálního LPS ve střevním lumen, tak i na intestinální absorpci LPS a tedy mají rozdílný pro-endotoxemický potenciál (Musso et al., 2010). Vysokotuková dieta snižuje expresi epitelových proteinů tight junctions, okcludinu a ZO-1, což je sekundárně spojeno se zvýšením intestinální permeability a endotoxémie. Tyto nálezy vedly k domněnce, že intestinální absorpce a sekrece tuku má dominantní roli v translokaci LPS střevní stěnou a v jeho vstupu do portální krve (Cani et al., 2009b). Vysokotuková dieta indukuje zvýšení plasmatického LPS ve srovnání s izokalorickou vysokouhlovdanovou dietou u myší. Vliv dietního tuku na zvýšení plasmatické hladiny endotoxinu byl potvrzen i v lidských studiích. V souboru 201 zdravých mužů korelovala signifikantně pozitivně hladina cirkulujícího LPS s 3-denním příjmem vysokotukové diety (Amar et al., 2008). U zdravých lidí zvyšuje vysokotuková dieta plasmatické koncentrace endotoxinu na hodnoty, které jsou *in vitro* schopné prostřednictvím uvolněného solubilního TNF- $\alpha$  z monocytů aktivovat lidské aortální endoteliální buňky (Erridge et al., 2007). Endotoxin může být aktivně translokován do krve prostřednictvím chylomikronů. Je však rovněž možné, že vliv zvýšené propustnosti střevní bariéry na translokaci LPS může být pouze sekundární (Ghoshal et al., 2009). Zajímavé je, že dalším nutrientem schopným indukovat „low-grade“ endotoxemii i zánětlivou reakci ve střevní sliznici může být také fruktóza (Spruss et al., 2009).

Uvedené nálezy tedy podporují představu o klíčové úloze endotoxémie v patogenezi zánětlivého procesu („low-grade“ zánětu) asociovaného s obezitou, stejně jako ji podporují představy o alimentárním ovlivnění plasmatické hladiny endotoxinu. Zásadní vliv na individuální složení střevní mikrobioty mají první roky života (Hansen et al., 2012). Proto kromě nutriční intervence může mít i ovlivnění složení střevní mikrobioty během časného dětství preventivní či terapeutický vliv na obezitu v dospělosti (Musso et al., 2010; Hansen et al., 2012). V prospektivní studii (Kalliomaki et al., 2008) měly 7-leté děti s obezitou nižší hladiny bifidobakterií a vyšší hladiny *Staphylococcus aureus* v 1. roce života na rozdíl od 7-letých neobézních dětí. Jiná studie (Santacruz et al., 2009) popisuje, že snížení obezity adolescentů dietou a cvičením je závislé na iniciálním složení mikrobioty před léčbou.

#### **2.3.4. Sekrece střevních peptidů – modulace integrity intestinální bariéry prostřednictvím glucagon-like peptidu 2**

Bariérová funkce tenkého střeva je mimo jiné udržována i sekrecí glucagon-like peptidu 2 (GLP-2). GLP-2 je enteroendokrinní peptid s inzulinotropickými vlastnostmi, secernovaný z intestinálních L-buněk společně s GLP-1 v odpovědi na luminální nutrienty. GLP-2 má trofický efekt na tenké střevo a stimuluje jeho funkce – zvyšuje počet proliferací krypt, elongaci klků a snižuje apoptózu (Tsai et al., 1997). U zvířat i lidí GLP-2 navozuje pocit sytosti (Estall a Drucker, 2006). GLP-2 se však rovněž účastní modulace intestinální permeability (Martin et al., 2004; Drucker, 2005; Estall a Drucker, 2006; Sigalet et al., 2006). Prostřednictvím GLP-2 může střevní mikrobiota modulovat integritu střevní bariéry a sérovou hladinu endotoxinu (Musso et al., 2010).

Cani et al. (2009b) testovali efekt fermentovatelné oligofruktózy z prebiotik na složení střevní mikrobioty, intestinální permeabilitu a hepatální a systémový zánět u *ob/ob* myši (obézní myši, zvířecí model diabetes mellitus 2. typu s výraznou inzulinovou resistencí). Ve srovnání s prostou uhlovodanovou dietou potrava obohacená o prebiotické uhlovodany zvyšovala množství a zastoupení lactobacilů a bifidobakterií ve střevech, chránila integritu tight junctions a střevní bariéry, snižovala endotoxémii a oxidativní stres. Tyto efekty jsou mediovány intestinálním GLP-2, který je zvýšeně produkován v odpovědi organismu na prebiotické uhlovodany. Prebiotika indukují sekreci GLP-2 a GLP-1. Vyšší endogenní uvolňování GLP-2 je spojeno se zlepšením bariérové funkce, vedoucí ke snížení sérové koncentrace LPS a zmírnění zánětlivé odpovědi (Cani et al., 2009a). Antagonisté GLP-2 brání pozitivním účinkům prebiotik ve střevě. Tyto nálezy naznačují, že změny ve střevní mikrobiotě by mohly ovlivňovat intestinální permeabilitu a zánět prostřednictvím GLP-2 a butyrát-dependentním mechanismem.

##### **2.3.4.1. Střevní mikrobiota moduluje sekreci intestinálního peptidu YY**

Intestinální peptid YY (PYY) je uvolňován z enteroendokrinních buněk v ileu a tlustém střevě v odpovědi na příjem potravy. Funkcí PYY je anorexigenní efekt, inhibice střevní motility, zvýšení střevní pasáže a snížení energetického využití potravy. Obézní osoby secernují méně PYY. Střevní mikrobiota syntetizuje velké množství glykosidových hydroláz,



keré štěpí rostlinné polysacharidy a mastné kyseliny s krátkým řetězcem, hlavně acetát, propionát a butyrát. Tyto sloučeniny jsou důležitým zdrojem energie pro lipogenezi *de novo*, avšak mastné kyseliny s krátkým řetězcem fungují také jako ligandy pro receptory spojené s G-proteinem, Gpr41 a Gpr 43, nacházející se na střevních enteroendokrinních buňkách. Vazba mastných kyselin na tyto receptory spouští kaskádu buněčných dějů vedoucích k stimulaci sekrece PYY, který redukuje chuť k jídlu a snižuje energetické využití potravy (Samuel et al., 2008).

#### **2.3.4.2. Střevní mikrobiota moduluje sekreci intestinálního glucagon-like peptidu 1**

Střevní mikrobiota může rozkládat prebiotika a tím podporovat diferenciaci L-buněk u potkanů a zvyšovat sekreci inkretinu GLP-1 po jídle u lidí (Cani et al., 2007b; Cani et al., 2009a). Střevní mikrobiota a GLP-1 mají synergický vliv na glukózový metabolismus, hmotnost i aktivaci zánětlivé kaskády (Cani et al., 2006; Zhou et al., 2008).

#### **2.3.5. Zvýšené energetické využití potravy u diabetes mellitus 2. typu**

V myším modelu je diabetes mellitus 2. typu provázen morfologickými a funkčními změnami tenkého střeva: tenké střevo je hypertrofické až hyperplastické se zvýšenou aktivitou disacharidáz, což vede ke zvýšené absorpci nutrientů (Adachi et al., 2003). Střevní mikrobiota může podporovat obezitu prostřednictvím zvýšené schopnosti kolonizovaného organismu extrahovat energii z potravy (Turnbaugh et al., 2006); organismem nestravitelné částice potravy jsou konvertovány mikrobiotou na stravitelné substráty, což zvyšuje energetickou extrakci z jídla. Nepatrné poruchy v energetické rovnováze, trvají-li několik let, mohou ovlivnit tělesnou hmotnost (Tsukumo et al., 2009).

Některá pozorování naznačují, že změny ve složení střevní mikrobioty mohou být příčinou (nikoliv však důsledkem) obezity: cékální mikrobiota myší v konvenční chovné kondici a myší obézních byla transplantována do střeva bezmikrobních myší. Myši kolonizované mikrobiotou obézních zvířat po dvou měsících extrahovaly více kalorií z potravy za současného nárůstu tukové hmoty a inzulínové rezistence ve srovnání s těmi,

kteřé byly kolonizovány mikrobiotou myši v konvenční chovné kondici (Turnbaugh et al., 2006; Turnbaugh et al., 2008; Turnbaugh et al., 2009).

### **2.3.6. Střevní mikrobiota reguluje složení mastných kyselin tukové tkáně a jater**

Střevní mikrobiota ovlivňuje složení tkáňových mastných kyselin; savčí intestinální laktobacilly a bifidobakterie syntetizují z volné linoleové kyseliny bioaktivní izomery konjugátů, které mají antidiabetické, antiaterosklerotické, imunomodulační a anti-obezitogenní vlastnosti (Terpstra, 2004). Potravinová suplementace kombinací *Bifidobacterium breve* a kyseliny linoleové (ve srovnání se suplementací potravy pouze kyselinou linoleovou) u různých druhů savců vedla k dvoj- až trojnásobnému zvýšení obsahu intestinálních, hepatálních a tukových konjugátů cis-9, trans-11 linoleových kyselin, eikosapentaenové kyseliny, dokosahexaenové kyseliny, společně se snížením exprese prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  (Wall et al., 2009).

Obezita může vzniknout při poruše periferního tukového metabolismu. Při stejném složení potravy mají bezmikrobní myši o 40 % nižší obsah tělesného tuku ve srovnání s myši chovanými v konvenčních podmínkách. Denní energetická spotřeba myši v konvenčních chovech je o 30 % nižší než spotřeba bezmikrobních myši. Myši kolonizované mikrobiotou obezních myši zvyšují svou tělesnou hmotnost v konvenčních chovech. Na základě těchto pozorování vznikla představa o potlačení exprese proteinu FFA (fasting-induced adipose factor) obezitogenní mikrobiotou, jež vede ke snížení oxidace mastných kyselin ve svalech a ke zvyšování depozice triglyceridů v tukové tkáni (Backhed et al., 2004). Střevní mikrobiota ovlivňuje energetický metabolismus jak ve směru energetického využití potravy a skladování energie (triglyceridů), tak i energetického výdeje prostřednictvím oxidace mastných kyselin. Mikrobiota tedy tímto způsobem může mediovat dietně indukovanou obezitu, inzulínovou resistenci a diabetes mellitus 2. typu (Musso et al., 2010).

### 3. ZÁVĚR TEORETICKÉ ČÁSTI

Intestinální bariéra se aktivně podílí na regulaci transportu makromolekul mezi zevním a vnitřním prostředím organismu. Bariérová funkce tenkého střeva má zásadní vliv na interakci mezi slizničním imunitním systémem a lumenálním obsahem zahrnujícím dietní a mikrobiální antigeny. Porucha bariérové funkce přispívá k systémové malfunkci medované imunitním systémem a k rozvoji některých onemocnění. Experimentální a klinická pozorování ukazují, že oba typy diabetes mellitus jsou spojeny se změnami intestinální bariéry. Zda je však intestinální bariérová dysfunkce primární příčinou rozvoje diabetes mellitus, či v jakém rozsahu se podílí na patogenezi jejích obou typů, zůstává doposud nezodpovězenou otázkou (Musso et al., 2010).

Studie na zvířecích modelech obou typů diabetes mellitus identifikovaly řadu faktorů vedoucích ke zvýšené permeabilitě střeva a k expozici lumenálních antigenů imunitním buňkám organismu. Tento jev by mohl následně přispívat jak k rozvoji autoimunitní inzulinity v případě diabetes mellitus 1. typu, tak ke vzniku periferní inzulinové rezistence jako důsledku metabolické endotoxémie a zvýšené produkce cytokinů v případě diabetes mellitus 2. typu.

Hygienická hypotéza, vysvětlující zvýšenou vnímavost k alergickým a autoimunitním chorobám včetně diabetes mellitus 1. typu, může zčásti objasnit i příčiny obezity a diabetes mellitus 2. typu. Kombinace vysokého hygienického standardu, nadužívání antibiotické léčby, příjmu vysokotukové a vysokokalorické diety a s tím související alterace ve složení střevní mikrobioty mohou zvyšovat riziko vzniku metabolických chorob (Kort et al., 2011).

Recentní studie zdůrazňují vliv vysokokalorické a vysokotukové diety na růst a dominanci deviantní („obezitogenní“) střevní mikrobioty modulující energetickou homeostázu hostitele, adipozitu, inzulinovou rezistenci a diabetes mellitus 2. typu. Střevní mikrobiota ovlivňuje energetické využití potravy, lipopolysacharidem indukovaný chronický zánět, modulaci složení tkáňových mastných kyselin i sekrece peptidů z L-buněk (Musso et al., 2010). V etiopatogenezi diabetes mellitus 1. typu je zvažováno (kromě vlivu „diabetogenní“ mikrobioty) také imunomodulační působení potravinových antigenů (zejména inzulinu kravského mléka a pšeničného glutenu) na vznik autoimunitní inzulinity.

Závěry studií na zvířecích modelech i randomizovaných studií u lidí dokumentují výhody dietních manipulací či podávání probiotik a prebiotik s cílem podpořit fyziologické složení střevní mikrobioty, a tím i posílit intestinální bariérovou funkci, což vede k prevenci rozvoje jak autoimunitního diabetes mellitus, tak inzulínové rezistence, k ovlivnění postprandiální sekrece inkretinů a ke zlepšení glukózové tolerance.

Komplexnější porozumění molekulárním mechanismům zahrnutých v regulaci intestinální bariéry může mít důležité klinické důsledky při léčbě a prevenci jak diabetes mellitus 1. typu, tak diabetes mellitus 2. typu a s ním příbuzných metabolických chorob. Z tohoto důvodu by se mohly preventivní či terapeutické intervence u diabetických a prediabetických pacientů zaměřovat i na posílení intestinální bariéry. Existuje několik intervenčních způsobů směřujících k ovlivnění střevní bariéry: (1) selekce přijímaných nutrietů s ohledem na jejich imunogenicitu, (2) kontrola složení střevní mikrobioty (prebiotiky, probiotiky a antibiotiky), (3) modifikace proteinů střevní bariéry a jiných regulačních proteinů a (4) potlačení zánětu zodpovědného za destrukci inzulín-produkujících beta buněk pankreatu či zánětu zodpovědného za inzulínovou rezistenci (Kort et al., 2011).

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE**

### **4.1. Úvod experimentální práce**

V posledních desetiletích je tenké střevo, zejména intestinální bariéra, předmětem narůstajícího vědeckého zájmu. Řada pozorování ukazuje na patogenetickou účast tenkého střeva v rozvoji takových onemocnění, která dříve nebyla do spojitosti s tímto orgánem dávána. Mezi tato onemocnění patří jak skupina autoimunitních chorob, tak skupina systémových metabolických chorob. Tedy i diabetes mellitus 1. typu a diabetes mellitus 2. typu se ukazují být patofyziologicky propojeny s tenkým střevem a s poruchou jeho bariérové funkce.

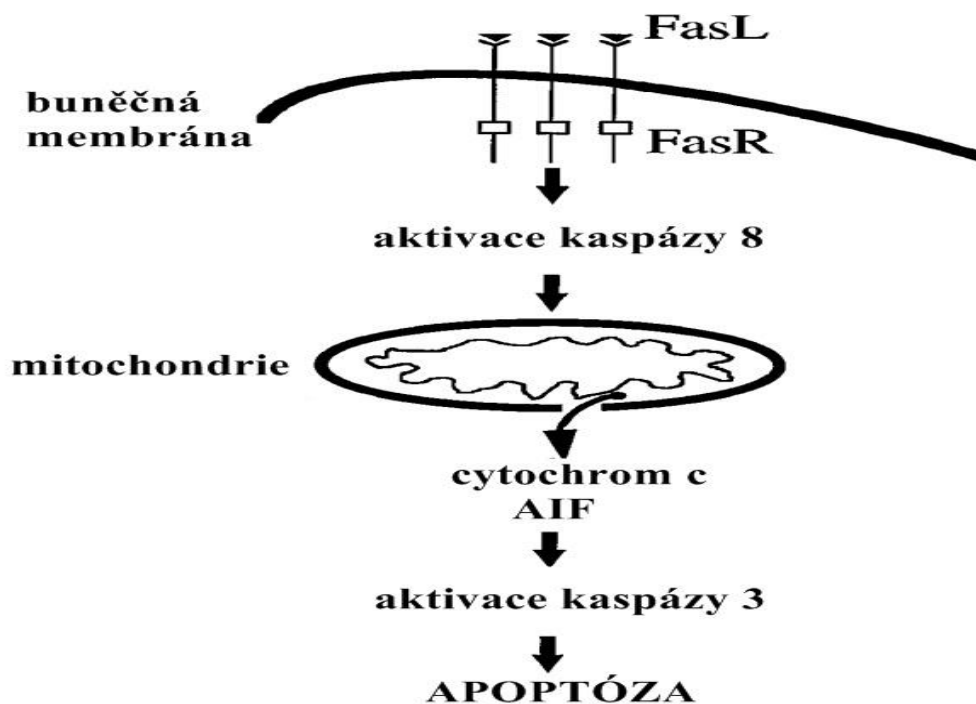
Mezi studované aspekty účasti intestinální bariéry v patofyziologii obou typů diabetes mellitus patří hodnocení funkčního stavu epitelové vrstvy tenkého střeva a hodnocení složek vrozené imunity, souvisejících s translokací bakteriálního lipopolysacharidu (LPS) z lumen střeva přes narušenou intestinální bariéru do systémového oběhu. V naší práci jsme se zaměřili na studium neinvazivních markerů hodnotících (1) apoptózu epitelových buněk, (2) poškození enterocytů a integrity enterocytární vrstvy a (3) aktivaci systému vrozené imunity ve vztahu k translokaci LPS u diabetes mellitus 1. a 2. typu.

Pro srovnání charakteru poruchy intestinální bariéry u diabetes mellitus 1. a 2. typu jsme vybrali celiakii, která je modelovým onemocněním typicky provázeným poruchou bariérové funkce střeva, tedy zvýšenou apoptózou enterocytů, dezintegrací enterocytární vrstvy, poruchou intestinální permeability a aktivací imunitního systému.

#### **4.1.1. Markery apoptózy epitelových buněk**

Buněčná smrt je za fyziologických okolností i za patologických stavů stejně důležitá jako buněčné dělení. Existují tři hlavní druhy buněčného zániku: apoptóza, autofágie a nekróza. Apoptóza je forma programované buněčné smrti mediovaná enzymy kaspázami (obrázek 2). Autofágie je proces, ve kterém se uplatňuje aktivita lysosomů. Nekróza je neregulovaný proces spojený s masivním uvolněním intracelulárního obsahu a vedoucí k zánětlivé reakci ve tkáni (Ueno et al., 2005).

**Obrázek 2. Intracelulární signalizační kaskáda apoptózy.** Po navázání Fas ligandu (FasL) na Fas receptor (FasR) dojde k trimerizaci Fas receptoru, což vede k formování multiproteinového komplexu (tzv. death-inducing signaling complex) zahrnujícího trimerizovaný receptor a cytosolické proteiny. Tento komplex aktivuje kaspázu 8, což vede k mitochondriální dysfunkci spojené s uvolněním cytochromu c a AIF (apoptosis inducing factor) do cytosolu. Dále pak dochází k aktivaci kaspázy 3, klíčové proteázy způsobující strukturální změny během apoptózy. Upraveno podle: Jones a Gores, 1997.



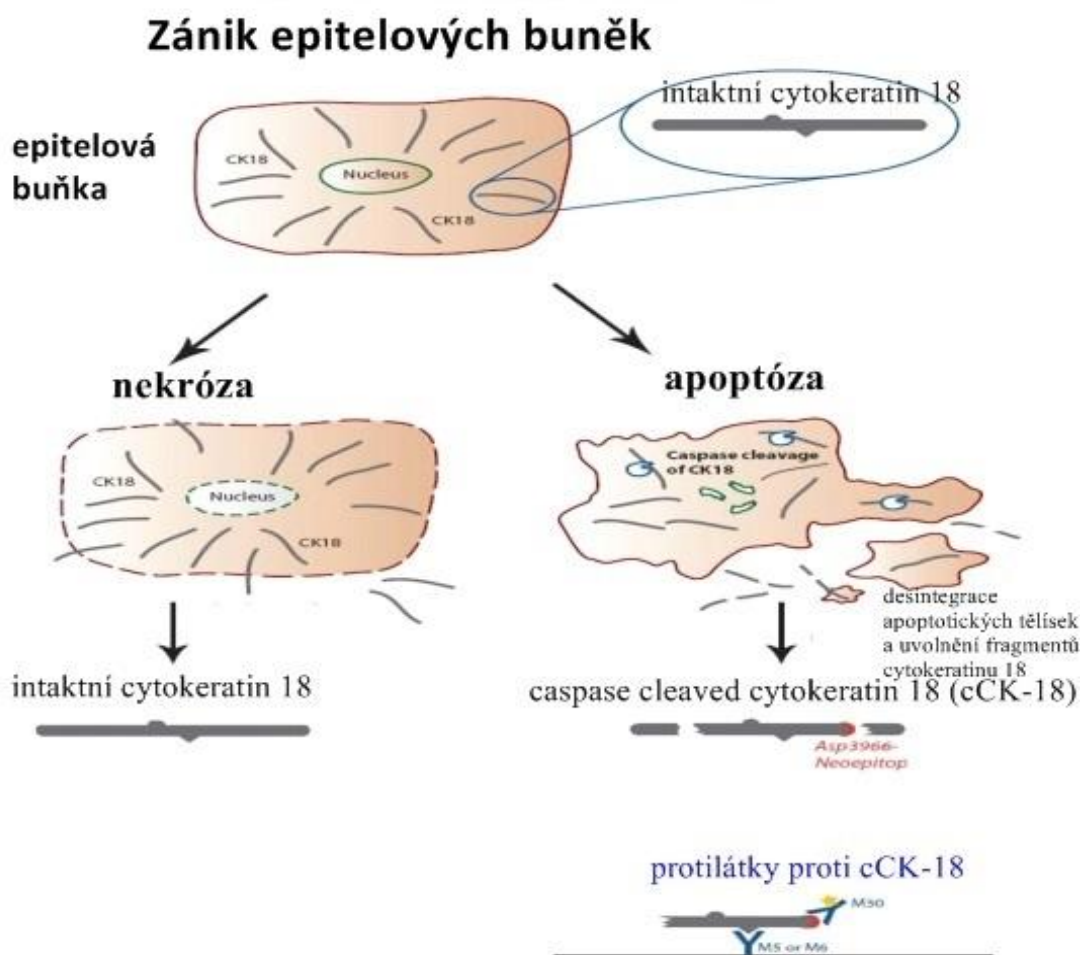
Apoptóza hraje důležitou roli v homeostáze střevního epitelu, ale představuje též stresovou odpověď na různé patologické stimuly. Regulovaný zánik buněk gastrointestinálního epitelu probíhá apoptózou. Existují dva hlavní typy apoptózy: spontánní apoptóza, která probíhá fyziologicky kontinálně v malé míře; a stresem indukovaná apoptóza (Jones a Gores, 1997; Watson a Pritchard, 2000). U spontánní apoptózy je počet apoptotických buněk shodný s počtem buněčných mitóz, takže zůstává zachováno množství epitelových buněk a tkáňová homeostáza. Patofyziologické procesy, které vedou k nadměrné stresem indukované apoptóze epitelových buněk se projevují poškozením epitelu, jeho atrofií a dysfunkcí. Naopak inhibice apoptózy vede k hyperplazii a podporuje maligní transformaci (Jones a Gores, 1997).

Zlatým standardem identifikace apoptózy je mikroskopické zobrazení charakteristických morfologických změn buňky, které nakonec vedou k rozpadu buňky na buněčnou membránou ohraničená tzv. apoptotická tělíska. Apoptotická tělíska jsou rychle fagocytována sousedními epitelovými buňkami a profesionálními fagocytujícími buňkami. Díky rychlosti celého procesu není apoptóza spojena se zánětlivou odpovědí ve tkáni. Apoptózu je obtížné v tkáních mikroskopicky detekovat, neboť probíhá rychle (během 2-4 hodin). Avšak během fagocytózy uvolňují apoptotická tělíska v limitovaném čase určité intracelulární složky do extracelulárního prostoru (Jones a Gores, 1997), které je možno detekovat v séru a slouží jako markery apoptózy.

#### **4.1.1.1. Fragmenty cytokeratinu 18**

Mezi intracelulární složky, jež jsou uvolňovány do extracelulárního prostoru během apoptózy epitelových buněk, patří fragmenty cytokeratinu 18. Cytokeratin 18 je intermediární filamentum specifické pro epitelové tkáně; představuje asi 5 % z celkového množství proteinů v játrech, exokrinním pankreatu, střevním epitelu a v ostatních epitelových tkáních. Experimenty in vitro ukázaly, že buněčné uvolnění fragmentů cytokeratinu 18 do extracelulárního prostoru je důsledkem štěpení cytokeratinu 18 kaspázou 3 během intermediární fáze apoptózy (Kramer et al., 2004). Cytokeratin 18 je štěpen kaspázou 3 na tři různé fragmenty, z nichž fragment zvaný *caspase cleaved cytokeratin-18* (cCK-18) je specificky rozpoznáván monoklonálními protilátkami komerčně pojmenovanými M30. Monoklonální protilátky M30 rozpoznávají neoepitopy cCK-18 na pozici 387 až 396 (tzv. CK18-Asp396). Naproti tomu během autofágie zůstává cytokeratin 18 nerozštěpen a během nekrózy je z buněk uvolňován rovněž nerozštěpený (Ueno et al., 2005) (obrázek 3). cCK-18 tedy slouží jako specifický marker apoptózy epitelových buněk (Kramer et al., 2004; Ueno et al., 2005; Luft et al., 2007), včetně apoptózy epitelových buněk tenkého střeva (Groos et al., 2003; Luft et al., 2007).

**Obrázek 3. Zánik epitelových buněk.** Při nekróze se uvolňuje do extracelulárního prostoru nerozštěpený, intaktní cytokeratin 18. Při apoptóze se uvolňují do extracelulárního prostoru kaspázou rozštěpené fragmenty cytokeratinu 18 (caspase cleaved cytokeratin 18; cCK-18).  
Upraveno podle: [www.peviva.com/product/m30-apoptosense-elisa](http://www.peviva.com/product/m30-apoptosense-elisa).



Ve zdravých tkáních dospělých jedinců je cCK-18 jen stěží detekovatelný; jeho akumulace je však prokazatelná za řady patologických situací (včetně chronických degenerativních onemocnění a metastatických procesů) ve slezině (Leers et al., 2002). V klinické praxi je navrhováno využití cCK-18 jako markeru proliferace a markeru hodnocení odpovědi na cytotoxickou léčbu u epitelových karcinomů (Hamilton, 2012) či jako markeru chronických jaterních onemocnění (Yilmaz, 2009). Odráží rovněž apoptózu epitelových buněk tenkého střeva (Groos et al., 2003; Luft et al., 2007), a proto jsme testování cCK-18 vybrali jako marker apoptózy enterocytů, resp. epitelových buněk tenkého střeva.



#### **4.1.2. Metody neinvazivního testování poškození enterocytů a integrity enterocytární vrstvy**

Integrita intestinální bariéry je zajišťována především funkčními enterocyty spojenými tight junctions, které utěsňují paracelulární prostory. Ztráta integrity může být hodnocena markery intestinálního epitelového poškození nebo markery poškození tight junctions a dále pomocí testů, jež posuzují důsledek této desintegrace, tj. (zvýšenou) intestinální permeabilitu. V souvislosti se zvýšenou intestinální permeabilitou dochází k translokaci střevního lumenálního obsahu (zejména bakterií, jejich metabolitů a částí jejich stěny např. LPS) do systémové cirkulace. K testování tohoto aspektu intestinální bariéry se užívají markery translokace bakterií nebo jejich produktů (Grootjans et al., 2010; Derikx et al., 2010).

##### **4.1.2.1. Markery intestinálního epitelového poškození**

Mezi markery, které odrážejí poškození epitelu tenkého střeva, patří fatty acid binding proteiny, glutathion S-transferáza a citrulin.

Fatty acid binding proteiny (FABP) jsou malé (14-15kDa) cytosolické, ve vodě rozpustné proteiny, jež se nacházejí ve vysokých koncentracích ve tkáních zahrnutých v absorpci a konzumaci mastných kyselin. Jsou tedy přítomny i ve zralých enterocytech tenkého střeva, kde fungují jako transportéry mastných kyselin z apikální membrány enterocytů do endoplasmatického retikula, kde probíhá biosyntéza komplexních lipidů (Pelsers et al., 2005). Ve střevě se nacházejí tři izoformy FABP: intestinální FABP (I-FABP), jaterní (liver) FABP (L-FABP) a ileal bile acid binding protein (I-BABP). I-FABP je exprimován zejména v jejunu a v malé míře v tlustém střevě; I-BABP v ileu a jejunu. L-FABP je exprimován zejména v hepatocytech, v menší míře i v enterocytech tenkého a tlustého střeva a v tubulárních buňkách ledvin; proto se nehodí jako marker izolovaného poškození tenkého střeva (Derikx et al., 2010; Pelsers et al., 2005). I-FABP je exprimován především v zralých enterocytech přítomných na vrcholu klků, což je místo, kde je iniciována destrukce enterocytů u řady intestinálních chorob. Podstatné je, že I-FABP se v jaterním parenchymu (na rozdíl od L-FABP) nevyskytuje. I-FABP se uvolňuje do systémové cirkulace z tenkého střeva specificky a vzhledem ke své malé molekule a rozpustnosti ve vodě i rychle při bezprostředním poškození integrity enterocytární membrány. Tyto skutečnosti činí z I-FABP

potenciálně užitečný a specifický marker časného, aktuálně probíhajícího poškození enterocytů (Derikx et al., 2010; Grootjans et al., 2010). FABP jsou rychle renálně eliminovány (poločas kolem 11 min) a lze je stanovit jak v plazmě, tak v moči užitím ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) metodiky. Basální hladiny I-FABP odrážejí fyziologický obrat enterocytů. V malých množstvích je I-FABP přítomen v krvi zdravých jedinců, zvýšené hladiny plasmatického nebo močového I-FABP byly nalezeny u pacientů s intestinální ischemií, se SIRS (systemic inflammatory response syndrome), s nekrotizující enterokolitidou; vysoké hladiny jsou detekovány u pacientů s intestinální ischemií během vaskulární chirurgie a u pacientů s mezenterálním infarktem (Grootjans et al., 2010; Derikx et al., 2010). Zdá se dokonce, že hladiny cirkulujícího I-FABP korelují s histologickým stavem epitelu v experimentálních studiích (Derikx et al., 2010).

Glutathion S-transferázy (GST) se podílejí na buněčně ochraně, antioxidantaci a detoxikaci celé řady toxických a cizorodých látek, které jsou konjugovány s glutathionem. Podskupina  $\alpha$ GST se predominantně nachází v tenkém střevě a tlustém střevě, játrech a ledvinách; a je některými autory považována za potenciální marker intestinálního epitelového poškození. Zvýšené plasmatické a močové hladiny  $\alpha$ GST byly popsány např. u pacientů s akutní mezenterální ischemií. Je však nutno zdůraznit, že zvýšená hladina  $\alpha$ GST rovněž ukazuje na poškození jaterního či ledvinného epitelu. Proto je tento marker vhodný jen v těch klinických situacích, kdy se předpokládá izolované poškození epitelu střeva (Derikx et al., 2010; Grootjans et al., 2010).

Citrulin je aminokyselina specificky produkovaná diferencovanými enterocyty tenkého střeva. Citrulin je syntetizován z glutaminu a není inkorporován do proteinů. Enterocyty jsou zodpovědné za hlavní část z celkového množství cirkulujícího citrulinu, a tak sérové hladiny citrulinu odrážejí funkční masu enterocytů. Snížení počtu (masy) enterocytů vede ke snížení hladiny cirkulujícího citrulinu (Crenn et al., 2008).

#### **4.1.2.2. Markery poškození tight junctions**

K posouzení stavu tight junctions se nejčastěji používá hodnocení intestinálních biopsií a mikroskopické posouzení jejich defektu, což je časově náročná procedura spojená s invazivním endoskopickým vyšetřením.

Nedávno bylo ukázáno, že imunohistochemicky vizualizovaná ztráta claudinu-3, hlavního těsnícího proteinu tight junctions, je provázena zvýšeným množstvím claudinu-3 v moči (Thuijls et al., 2010). Měření koncentrace claudinů (zejména v moči) poskytuje informace o paracelulární složce střevní bariéry. Zejména claudin-3 se ukazuje být vhodným neinvazivním markerem detekujícím ztrátu integrity tight junctions u pacientů s nespecifickými střevními záněty, nekrotizující enterokolitidou či po vaskulárních chirurgických výkonech. Interpretace výsledků však vyžaduje zohlednění faktu, že distribuce tight junctions není limitována pouze na střevo (Grootjans et al., 2010).

#### **4.1.2.3. Testování intestinální permeability**

Permeabilita střevní bariéry úzce souvisí s funkcí tight junctions, které hrají zásadní roli v regulaci paracelulárního transportu (Arrieta et al., 2006; Anderson a Van Itallie, 2009). Střevní permeabilita je testována perorálním podáváním radioaktivně značených monosacharidů (manitol, L-rhamnóza), disacharidů (laktulóza, sukralóza), polyetylglykolů o různé molekulové hmotnosti či nedegradabilních chelátů (např.  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ ), jejichž koncentrace je v časových odstupech (nejčastěji po 24 hodinách) měřena v moči. Základními požadavky na látky pro testování střevní propustnosti je nízká molekulová hmotnost, neštěpitelnost v gastrointestinálním traktu, hydrofilita, biokompatibilita, kompletní exkrece ledvinami a snadná detekovatelnost v moči. Analýza střevní propustnosti využívající stanovení pouze jedné takové molekuly může vykazovat značnou metodickou zátíženost, neboť neexistuje objektivní kompenzace interindividuální variability (rozdíly v rychlosti intestinální pasáže a v rychlosti exkrece močí). Z tohoto důvodu konstrukce testů střevní propustnosti nejčastěji využívá detekce dvou molekul lišících se způsobem transportu přes stěnu tenkého střeva – disacharidů (např. laktulóza) transportovaných paracelulárně, cestou tight junctions a monosacharidů (např. manitol, rhamnóza) transportovaných transcelulárně. Výsledky testů střevní propustnosti poskytují údaje o množství molekul perorálně podaných, vyloučených močí za 24 hodin a jejich vzájemných poměrech. Poměr koncentrací laktulóza/manitol či laktulóza/rhamnóza koresponduje s podílem paracelulárního a transcelulárního transportu střevní stěnou (Kort et al., 2011).

V tenkém střevě zdravých jedinců je nižší prostupnost pro cukry s vyšší molekulovou hmotností (např. laktulóza) oproti cukrům o menší molekulové hmotnosti (např. manitol,

rhamnóza); velké molekuly (laktulóza) totiž nejsou schopny paracelulárního transportu cestou tight junctions. Mechanismus paracelulárního transportu ve zdravém střevě tedy tvoří nižší podíl než transport transcelulární.

Za patologického stavu, jakým je např. chronický slizniční zánět, se permeabilita pro větší cukry zvyšuje mechanismem paracelulárního transportu, zatímco permeabilita pro malé cukry transcelulárním transportem zůstává stabilní nebo klesá – poměr laktulóza/manitol resp. laktulóza/rhamnóza je proto při poruše bariérové funkce střeva zvýšen. Paracelulární transport je regulován prostřednictvím tight junctions, zvýšený paracelulární transport tedy odpovídá zvýšené střevní propustnosti (Murphy et al., 1989).

Testy hodnotící močové poměry různých oligosacharidů (laktulóza, celobióza) a monosacharidů (manitol, L-rhamnóza), poměry polyetylglykolů (PEG) o různé velikosti či radioaktivně značené makromolekuly <sup>51</sup>Cr-EDTA vykazují srovnatelné výsledky. Problémem je, že některé sacharidy, jako např. laktulóza, mohou zvyšovat intestinální motilitu, proto jejich perorálně podané množství musí být co nejmenší. Laktulóza je navíc degradována bakteriemi v tlustém střevě. Zvýšená intestinální permeabilita hodnocená zmíněnými testy byla popsána u řady onemocnění (zejména u Crohnovy choroby, celiakie, potravních intolerancí či u kriticky nemocných pacientů). Avšak toto testování pro značnou nepraktičnost nezaujalo místo v klinické praxi ani jako součást diagnózy, ani při sledování pacientů (van Nieuwenhoven et al., 2000; Demeo et al., 2002).

#### **4.1.2.4. Markery translokace bakterií nebo jejich produktů**

Mezi plasmatické markery odrážející translokaci bakterií nebo jejich produktů patří lipopolysacharid (LPS) a D-laktát (Grootjans et al., 2010; Derikx et al., 2010).

LPS neboli endotoxin je hlavní složkou zevní membrány gram-negativních bakterií. Nejvyšší koncentrace LPS je ve střevním lumen, kde sídlí mnoho trilionů komensálních gram-negativních bakterií. K jeho uvolňování dochází při replikaci nebo zániku bakterií. Luminální LPS proniká ve zdravém střevě intaktní epitelovou bariérou v klinicky nevýznamném množství. Avšak při stavech spojených s poruchami intestinální permeability dovolují defektní tight junctions paracelulární permeaci LPS, vedoucí k zvýšeným hladinám LPS v intestinální tkáni a v systémové cirkulaci (Hurley, 1995; Guo et al., 2013). LPS v nízkých sérových koncentracích, tj. v tzv. fyziologicky relevantních koncentracích (0-1,0 ng/ml) a tzv.

klinicky relevantních koncentracích (0-10 ng/ml) nezpůsobuje buněčnou smrt enterocytů či poškození enterocytů, ale vyvolává selektivní zvýšení střevní permeability cestou tight junctions jak in vitro, tak in vivo. Přičemž centrální roli v této modulaci intestinálních tight junctions hrají receptory TLR4 a CD14 (Abreu, 2010; Funda et al., 2001). Extrémně vysoké hladiny sérového LPS vedou k indukci mnohočetných patofyziologických dějů zahrnujících sepsi, horečku, leukocytózu, trombocytopenii a koagulopatii (Hurley, 1995). Přítomnost LPS může být měřena v krvi přímo - metodou zvanou LAL (limulus amebocyte lysate) assay nebo nepřímo - stanovením protilátek proti LPS, tj. endotoxin core antibody (EndoCAb). Specifita LAL assay je však velmi nízká, neboť falešně pozitivní výsledky mohou být způsobeny produkty stěny hub, gram-pozitivních bakterií, polynukleotidy či kontaminací exogenním endotoxinem (Hurley, 1995; Cohen, 2000). Sérové hladiny EndoCAb vykazují vysokou interindividuální variabilitu, což představuje nevýhodu pro interpretaci výsledků (Barclay, 1999).

D-laktát je fermentační produkt řady bakterií přítomných v lidském gastrointestinálním traktu. Nízké plasmatické hladiny D-laktátu se nacházejí u zdravých jedinců. Řada studií prokázala vztah mezi plasmatickou hladinou D-laktátu a zvýšenou intestinální permeabilitou. Hladina D-laktátu má hodnotu zejména při posuzování ischemického postižení tlustého střeva; výsledky však mohou být nadhodnoceny v těch klinických situacích, kde dochází k bakteriálnímu přerůstání ve střevě, neboť v těchto případech zvýšená přítomnost bakterií zvyšuje fermentaci nestravitelných uhlovodanů na D-laktát (Herrera et al., 2008).

Z výše uvedených neinvazivních markerů poškození enterocytů a integrity enterocytární vrstvy jsme vybrali I-FABP, neboť se zdá být nejvíce histospecifický (Derikx et al., 2010).

#### **4.1.3. Marker aktivace systému vrozené imunity a translokace lipopolysacharidu**

Z imunitních mechanismů zapojených do poruchy bariérové funkce tenkého střeva jsme se zaměřili na posouzení těch složek vrozené imunity, které mimo jiné souvisí i s translokací bakteriálního LPS alterovanou intestinální bariérou. K tomuto účelu jsme zvolili

testování sérové hladiny solubilního CD14 (sCD14). Sérová hladina sCD14 je považována za specifický a senzitivní marker aktivace systému vrozené (nespecifické) imunity a bioaktivity LPS v systémové cirkulaci (Litzman et al., 2012). Receptory CD14 společně s toll-like receptory (TLRs) mají zásadní roli v aktivaci systému vrozené imunity a v první linii obrany proti invadujícím mikrobům. Zejména TLR4 (resp. receptorový komplex CD14/TLR4/MD2) je nutný pro aktivaci vrozené imunitní obrany proti LPS gramnegativních bakterií. TLRs a receptory CD14 tak mohou představovat spojení mezi intestinální mikrobiotou, alterací intestinální bariéry a imunitně medioványi chorobami (Cook et al., 2004). Podrobnosti osvětlují následující dvě podkapitoly.

#### **4.1.3.1. Některé aspekty vrozené imunitní odpovědi v tenkém střevě**

Zahájení vrozené imunitní odpovědi v tenkém střevě je umožněno receptory rozpoznávajícími patogenní vzory (PRRs, pattern recognition receptors). PRRs fungují jako senzory (1) mikrobiálních antigenů (MAMPs, microbe-associated molecular patterns) z intestinálního lumen a (2) tzv. DAMPs (damage-associated molecular patterns), což jsou endogenní molekuly produkované buňkami v rámci odpovědi na poškození či stresové stimuly. Prototypem antigenu typu MAMPs je bakteriální LPS.

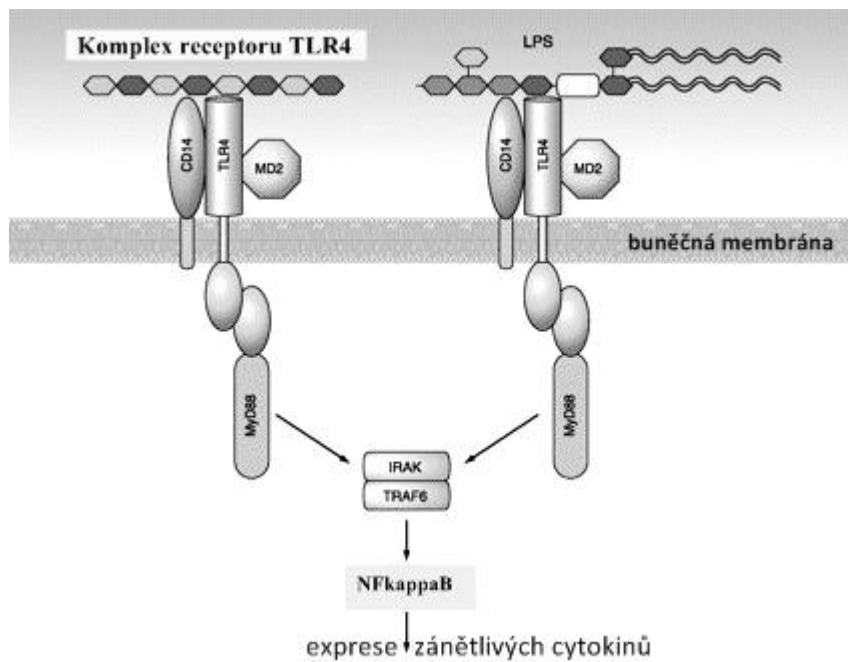
Nejvíce studovanými PRRs jsou TLRs. V tenkém střevě jsou TLRs exprimovány jednak intestinálními epitelovými buňkami (buď na jejich povrchu nebo v endosomech) a jednak na povrchu imunitních buněk v lamina propria mucosae. Aktivace TLRs stimuluje zánětlivou odpověď cestou signální kaskády NF- $\kappa$ B, s následnou produkcí cytokinů a chemokinů, které atrahují další buňky zúčastněné v akutní zánětlivé odpovědi (Santaolalla a Abreu, 2012).

TLRs signalizace v tenkém střevě je zapojena do proliferace epitelových buněk (Fukata et al., 2006), do produkce IgA (Shang et al., 2008), do udržení stavu tight junctions (Cario et al., 2004) a do sekrece antimikrobiálních peptidů, tj. do funkcí, které jsou zásadně důležité pro udržení integrity intestinální bariéry (Hooper a Macpherson, 2010).

#### 4.1.3.2. Solubilní CD14

CD14 (cluster of differentiation antigen 14) je 53-kDa glykoprotein a existuje ve dvou formách: (1) membránový CD14 (mCD14), který je ukotven v buněčné membráně glycosyl-phosphatidyl-inositolovou kotvou a (2) solubilní CD14 (sCD14). Solubilní CD14 vzniká z mCD14 odštěpením glycosyl-phosphatidyl-inositolové kotvy pomocí proteáz nebo je přímo secernován z intracelulárních vesikul (Funda et al., 2001). Buňky různých tkání exprimují různé formy CD14. Membránový CD14 je exprimován predominantně na buněčném povrchu myeloidních buněk (monocytů, neutrofilů) a makrofágů, tedy buněk systému vrozené imunity; zatímco sCD14 je exprimován na ostatních buňkách, včetně enterocytů, hepatocytů, beta-buněk pankreatu a adipocytů (Funda et al., 2001; Fernández-Real et al., 2011; Vives-Pi et al., 2003). Obě formy CD14 fungují jako receptory (PRRs) systému vrozené imunity; interagují s rozličnými antigenními molekulami, zejména s LPS gram-negativních bakterií. Membránový CD 14 je součástí komplexu toll-like receptoru 4 (TLR4). Tento receptorový komplex (CD14/TLR4/MD2) je schopen specificky vázat bakteriální lipopolysacharid (LPS). Po vazbě LPS signalizuje prostřednictvím řady intracelulárních drah a aktivuje NF- $\kappa$ B, což následně vede k produkci množství zánětlivých cytokinů (např. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, a IL-8) a adhezních molekul (obrázek 4) (Jiang et al., 2000). Bylo prokázáno, že bakteriální LPS indukuje zvýšení permeability tight junctions prostřednictvím zvýšením exprese TLR4 v apikální membráně enterocytů a TLR4 dependentním zvýšením exprese mCD14 (Guo et al., 2013).

**Obrázek 4. Komplex receptoru TLR4.** Lipopolysacharid (LPS) se váže na buněčném povrchu na receptorový komplex CD14/TLR4/MD2. Na cytoplasmatické straně buněčné membrány TLR4 interaguje s MyD88 (myeloid differentiation protein 88), dochází k aktivaci kaskády zahrnující IRAK (interleukin-1 receptor associated kinase), TRAF6 (tumor-necrosis-factor-receptor-associated factor 6) a finálně nukleární faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B), což vede k transkripční aktivaci genů a expresi zánětlivých cytokinů. Upraveno podle <http://physrev.physiology.org/content/91/1/221>.



sCD14 je secernován především játry a monocyty a chová se jako protein akutní fáze; je považován za všeobecný indikátor aktivace imunitního systému. sCD14 je schopen specificky vázat LPS v extracelulárním prostoru; nachází se v séru, mozkomíšním moku či v jiných tělesných tekutinách, a umožňuje buňkám, kterým chybí endogenní mCD14, odpovídat na LPS (Tapping a Tobias, 2000). In vivo za fyziologických podmínek jsou intestinální epitelové buňky kontinuálně exponovány LPS ze střevní mikrobioty a hrají důležitou roli v přirozené slizniční imunitě. In vitro byl mCD14 exprimován na lidských intestinálních epitelových buňkách po jejich expozici LPS a rovněž byl těmito buňkami



uvolňován v podobě sCD14 (Funda et al., 2001). Pokud vezmeme v úvahu obrovské množství epitelových buněk v slizničním kompartmentu a fakt, že u lidských epitelových buněčných linií byla popsána polarizovaná basolaterální sekrece různých cytokinů, chemokinů či proteinů akutní fáze (Molmenti et al., 1993), pak je pochopitelné, že dokonce malé hladiny uvolňovaného sCD14 z epitelových buněk mohou vést k měřitelné hladině v séru (Funda et al., 2001).

Řada dat ukazuje, že ve fyziologickém slizničním mikroprostředí tenkého střeva makrofágy lamina propria mucosae snižují expresi mCD14, ale zánětlivé procesy probíhající ve sliznici tenkého střeva (např. celiakie či nespecifické střevní záněty) vedou ke zvýšení exprese mCD14 (Funda et al., 2001). Jakožto pattern recognition receptor je CD14 schopen kromě LPS vázat široké spektrum přirozených a syntetických ligandů, včetně součástí apoptotické buňky (Devitt et al., 1998; Kelley et al., 2013).

#### **4.1.4. Celiakie**

Celiakie je modelovým autoimunitním onemocněním tenkého střeva, které je nezpochybnitelně spojeno s poruchou intestinální bariérové funkce a v jehož patofyziologii dochází k aktivaci mechanismů vrozené i adaptivní imunity (Schuppan a Zimmer, 2013; Lundin a Sollid, 2014).

##### **4.1.4.1. Definice, klinické projevy, diagnostika a léčba celiakie**

Celiakie je definována jako permanentní senzitivita k potravou přijímanému lepku, glutenu (zásobnímu proteinu pšenice, ječmene, žita a řady odrůd ovesa) vedoucí k autoimunitnímu postižení tenkého střeva - autoimunitní enteropatii, jež je spojena i s poruchou jiných orgánů. Vzniká u geneticky predisponovaných jedinců nesoucích haplotyp II. třídy HLA systému DQ2 nebo DQ8 a konzumujících potraviny obsahující gluten. Celiakie představuje naléhavý problém současné medicíny - postihuje celosvětově přibližně 1 % populace. Může se objevit v jakémkoliv věku a klinické spektrum jejích příznaků je velmi široké, zahrnující jak (1) typické – střevní projevy (chronický či intermitentní průjem, příznaky spojené se střevní distenzí - nadýmání, bolesti břicha, nechutenství, zvracení, ale i zácpa), tak (2) atypické – mimostřevní projevy vyplývající z malabsorpce či z imunologické poruchy intestinální bariéry (porucha růstu, váhový úbytek, malnutrice, únavnost, sideropenická

anémie, osteopenie a osteoporóza, osteomalacie, dermatitis herpetiformis, hypoplazie zubní skloviny, aftózní stomatitída, elevace transamináz, artritidy, artralgie, myalgie, neurologické problémy, ataxie, bolesti hlavy, periferní neuropatie, křečové stavy, psychiatrické poruchy, infertilita, opožděný nástup puberty, asociované autoimunitní choroby - zejména autoimunitní tyreoiditída, diabetes mellitus 1. typu, Addisonova choroba, polyglandulární syndromy) a dále i (3) asymptomatické (silentní) případy diagnostikované v rámci aktivního skríninku (Tack et al., 2010; Schuppan a Zimmer, 2013; Lundin a Sollid, 2014; Guandalini a Assiri, 2014).

Prevalence celiakie u pacientů s diabetes mellitus 1. typu je uváděna mezi 1,3 % a 16,4 %. Tato preferenční asociace obou chorob je vysvětlována společnou genetickou dispozicí; přibližně 95 % pacientů s celiakií jsou nositeli HLA-DQ2 antigenu, který je současně považován za rizikový genetický faktor pro rozvoj diabetes mellitus 1. typu (van Autreve et al., 2004).

Diagnóza celiakie je založena na séropozitivě specifických celiakálních autoprotilátek (proti tkáňové transglutamináze, proti endomyziu, ev. proti deamidovaným gliadinovým peptidům) (Guandalini a Assiri, 2014) a zejména u dospělých i na histologickém průkazu změn sliznice tenkého střeva hodnocených čtyřmi stadii dle Marshe (Marsh, 1992): stadium 0 (normální sliznice); stadium 1 (zvýšený počet intraepiteliálních lymfocytů), stadium 2 (znaky stadia 1 + hyperplazie krypt); stadium 3 (znaky stadia 2 + vilózní atrofie; 3a – parciální, 3b – subtotální, 3c – totální vilózní atrofie), stadium 4 (celková atrofie sliznice). Za histopatologické změny tenkého střeva nutné pro diagnózu celiakie se považují všechna stadia nad 2 (včetně), tedy zvýšený počet CD3+ intraepiteliálních lymfocytů, hyperplazie krypt a vilózní atrofie (atrofie slizničních klků) (Walker a Murray, 2011; Schuppan a Zimmer, 2013). V současnosti se jako nejlepší sérologické testy ukazují imunoglobulin A (IgA) protilátky proti tkáňové transglutamináze a IgA antiendomysialní protilátky. Obojí mají srovnatelnou diagnostickou spolehlivost se specificitou blízko 100 % a senzitivitou mezi 90-98 %. V případě přítomnosti IgA deficitu je však třeba testovat tyto autoprotilátky ve třídě IgG (Rostom et al., 2005; Vande Voort et al., 2009). K zamezení falešné negativity diagnostických testů je nutné nezahajovat bezlepkovou dietu před definitivním stanovením diagnózy. Jedinou možnou terapií celiakie je celoživotní úplná bezlepková dieta. Pravidelná lékařská péče o jedince s celiakií je zaměřena na kontrolu adherence k bezlepkové dietě

(včetně hodnocení sérových hladin celiakálních autoprotilátek, jež se při dodržování bezlepkové diety normalizují), na posouzení a léčbu skrytých projevů malabsorpce či přidružených autoimunitních chorob (Guandalini a Assiri, 2014).

#### **4.1.4.2. Porucha mechanismů adaptivní a vrozené imunity u celiakie**

Celiakální autoimunitní enteropatii způsobuje nepřiměřená imunitní odpověď na gluten. Aktivace imunitní odpovědi zahrnuje mechanismy jak vrozené, tak adaptivní imunity (Schuppan a Zimmer, 2013; Lundin a Sollid, 2014). O zapojení adaptivní imunity zprostředkované T- a B- lymfocyty existuje u celiakie řada silných důkazů. Centrální roli v imunopatogenezi celiakie hrají gluten-reaktivní T-lymfocyty aktivované v lamina propria mucosae tenkého střeva. V posledních letech bylo detailně popsáno, jak gluten-reaktivní CD4+ T-lymfocyty rozpoznávají deamidované gliadinové epitopy v kontextu s antigeny HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8 přítomnými na antigen-prezentujících buňkách (Broughton et al., 2012; Qiao et al., 2011).

Důkazy o aktivaci vrozené imunity u celiakie jsou poměrně recentní. Ukazuje se, že gluten indukuje ve sliznici tenkého střeva maturaci dendritických buněk a přispívá k aktivaci systému vrozené imunity (Palová-Jelínková et al., 2005; Palová-Jelínková et al., 2013). O zapojení vrozené imunity svědčí i pozorování, že *in vitro* gliadinová stimulace sliznice duodena získané biopsií vede k aktivaci pouze systému vrozené imunity (Maiuri et al., 2003).

Jako pšeničné komponenty, které byly izolovány společně s určitými glutenovými peptidy a které rovněž aktivují vrozenou imunitní odpověď, byly popsány inhibitory  $\alpha$ -amylázy a trypsinu (ATIs,  $\alpha$ -amylase trypsin inhibitors). ATIs stimulují TLR4, konkrétně dráhu TLR4/MyD88 (Junker et al., 2012).

Antigen-prezentující buňky v lamina propria mucosae celiakálních pacientů lze rozdělit na CD11c+ dendritické buňky (DCs) a CD68 +CD11c2 makrofágy. Většina DCs koexprimuje monocytární marker CD14, což naznačuje, že tyto buňky pocházejí z krevních monocytů. U celiakální slizniční léze byla dokumentována zvýšená denzita DCs koexprimujících CD14 (Beitnes et al., 2012).

## 4.2. Hypotézy, cíle práce

Problematika vztahu mezi poruchou intestinální bariéry tenkého střeva a diabetes mellitus 1. a 2. typu je intenzivně zkoumána v řadě souvislostí, jak bylo popsáno v teoretickém úvodu této dizertační práce. Menší pozornost byla dosud věnována studiu funkčního hodnocení epitelové, resp. enterocytární vrstvy tenkého střeva a zapojení složek vrozené imunity.

Cílem práce bylo analyzovat poškození bariéry tenkého střeva na úrovni epitelové vrstvy u pacientů s diabetes mellitus 1. typu a 2. typu a porovnat je s charakterem tohoto poškození u modelového onemocnění spojeného s poruchou intestinální bariéry, jakým je celiakie.

Za tímto účelem jsme testovali sérové hladiny tří markerů, z nichž každý hodnotí odlišný aspekt poškození intestinální epitelové bariéry:

- 1) marker apoptózy epitelových buněk: cCK-18 (cytokeratin 18 caspase-cleaved fragment)
- 2) marker poškození enterocytů a dezintegrace enterocytární vrstvy tenkého střeva: I-FABP (intestinal fatty acid binding protein)
- 3) marker aktivace systému vrozené imunity: sCD14 (solubilní CD14)

Studie hodnotící tyto parametry u pacientů s diabetes mellitus nebyla dosud publikována.

S ohledem na cíl práce jsme formulovali následující hypotézy:

**Hypotéza 1: A)** Je u diabetes mellitus 1. typu a 2. typu prokazatelné poškození epitelové bariéry tenkého střeva? **B)** Je toto poškození odlišné od charakteru poškození u celiakie?

**Hypotéza 2:** Koreluje poškození epitelové bariéry tenkého střeva u diabetes mellitus 1. typu s:

A) délkou trvání diabetes mellitus?

B) parametrem kompenzace diabetes mellitus, tj. hladinou glykosylovaného hemoglobinu?

**Hypotéza 3:** Koreluje poškození epitelové bariéry tenkého střeva u diabetes mellitus 2. typu s:

A) délkou trvání diabetes mellitus?

B) parametrem kompenzace diabetes mellitus, tj. hladinou glykosylovaného hemoglobinu?

C) body mass indexem?

**Hypotéza 4:** Je poškození epitelové bariéry tenkého střeva u pacientů s celiakií příznivě ovlivnitelné bezlepkovou dietou?

### 4.3. Metodika

#### 4.3.1. Výběr pacientů a kontrolní skupiny

Do studie byli zařazeni pacienti léčení ambulantně nebo na lůžkových odděleních 2. interní kliniky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze.

Studie zahrnovala skupiny dospělých pacientů s následujícími charakteristikami:

- 1) pacienti s diabetes mellitus 1. typu s aktuálně probíhající inzulinííou (T1D/INS) dokumentovanou průkazem séropozitivity ostrůvkových autoprotilátek anti-GAD (anti-glutamic acid decarboxylase) a anti-IA2 (anti-islet antigen2) (Nokoff et al., 2012);
- 2) pacienti s diabetes mellitus 1. typu s vyhaslou inzulinííou (T1D) dokumentovanou aktuální séronegativitou anti-GAD a anti-IA2 autoprotilátek, avšak dokumentovanou pozitivitou těchto autoprotilátek v minulosti;
- 3) pacienti s diabetes mellitus 2. typu (T2D) bez ohledu na typ léčby.
- 4) pacienti s recentně diagnostikovanou (tj. neléčenou) celiakií (CLD). Diagnóza celiakie byla stanovena dle modifikovaných kriterií ESPGHAN (Husby et al., 2012), tj. na základě současné přítomnosti séropozitivity celiakálních autoprotilátek (protilátky proti tkáňové transglutamináze (anti-tTG) ve třídě IgA; protilátek proti endomysiu (EMA) ve třídě IgA) a přítomnosti charakteristických histologických změn duodenální sliznice (odebrané při esofago-gastro-duodenoskopickém vyšetření) klasifikovaných stadiem 3a-c dle Marshovy

klasifikace (Marsh, 1992). Pacienti s recentní celiakií v době odběru krve ještě nezahájili bezlepkovou dietu.

5) pacienti s celiakií (CLD-GFD) léčení bezlepkovou dietou (gluten-free diet, GFD). Byli vybráni celiakální pacienti dodržující bezlepkovou dietu přísně a minimálně 12 měsíců, což bylo doloženo normalizací výše uvedených celiakálních autoprotilátek (anti-tTG a EMA) a vymizením vstupní symptomatologie.

Kontrolní skupinu (C) tvořili zdraví jedinci z řad krevních dárců, zaměstnanců 2. interní kliniky, jejich příbuzných a studentů 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Nikdo z testovaných pacientů i z kontrolní skupiny neměl jiné autoimunitní onemocnění, nádorové onemocnění (ani v osobní anamnéze) či v době testovacího odběru aktuálně probíhající infekční či zánětlivé onemocnění. Rovněž jedinci s abnormálními hladinami běžných laboratorních vyšetření (kreatinin, urea, jaterní testy, C-reaktivní protein, albumin) či deficitem imunoglobulinů nebyli do studie zařazeni. Pacienti s T1D/INS, T1D a T2D, kteří měli závažnou komplikaci diabetes mellitus, nebyli také do studie zahrnuti. Tabulka 1 shrnuje počet, věk a pohlaví testovaných pacientů s CLD, CLD-GFD, T1D/INS, T1D, T2D a kontrolní skupiny (C).

**Tabulka 1.** Charakteristika počtu, věku a pohlaví testovaných pacientů a kontrolní skupiny.

Testovaná skupina	Počet	Průměr věku, (rozmezí věku)	Pohlaví M/Ž
Celiakie recentně diagnostikovaná (CLD)	43	30,8 (18-46)	17/26
Celiakie na bezlepkové dietě (CLD-GFD)	12	41,2 (22-77)	3/9
Diabetes mellitus 1. typu s přítomnou inzulinídiou (T1D/INS)	20	53,5 (20-87)	12/8
Diabetes mellitus 1. typu (T1D)	20	47,1 (20-78)	13/7
Diabetes mellitus 2. typu (T2D)	30	66,3 (41-84)	18/12
Kontrolní skupina (C)	41	39,4 (18-81)	22/19

Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha a respektovala principy Helsinské deklarace. Všichni účastníci studie podepsali informovaný souhlas (příloha 1).

#### 4.3.2. Popis rutinních laboratorních a klinických vyšetření

Rutinní sérologická vyšetření byla provedena v Ústavu laboratorní diagnostiky 3. lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, histologické nálezy duodenální sliznice byly hodnoceny v Ústavu patologie 3. lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady.

Pro stanovení hladiny anti-tTG IgA protilátek byl užit ELISA kit (Biosystems SA, Barcelona, Spain); pro hodnocení EMA protilátek nepřímá imunofluorescence (Indirect immunofluorescence - monkey oesophagus AEA - Anti Endomysium antibodies, Biosystems SA, Barcelona, Spain); pro anti-GAD protilátky: Medizym Anti-GAD ELISA kit (MEDIPAN GMBH, Dahlewitz/Berlin, Germany); pro anti-IA2 protilátky Medizin Anti-IA2 ELISA kit (MEDIPAN GMBH, Dahlewitz/Berlin, Germany). Sérová hladina imunoglobulinů byla měřena nephelometricky (BNII analyzér, Dade Behring – Siemens); hladina albuminu pomocí Colorimetric assay with bromocresol green and ADVIA 1800 and Cobas 8000 and Cobas 6000 analyzér (Siemens Healthcare Diagnostics, and Roche Diagnostics); hladina C-reaktivního proteinu (CRP) byla stanovena imunoturbidimetrií (Siemens Healthcare Diagnostics, and Roche Diagnostics). Tabulka 2 shrnuje biochemickou, imunologickou a histologickou charakteristiku testovaných skupin.

V rámci klinického vyšetření byla u všech pacientů i u kontrolní skupiny provedena abdominální ultrasonografie (ultrasonografický přístroj Philips HD 11 XE) k posouzení přítomnosti jaterní steatózy. Jaterní steatóza byla hodnocena pomocí abdominální ultrasonografie ve dvou stupních: jako mírná a jako výrazná steatóza ve shodě s metodickým přístupem Sanyala (Sanyal, 2002).

**Tabulka 2.** Základní biochemická, imunologická a histologická charakteristika testovaných skupin.

C - kontrolní skupina; CLD - recentně diagnostikovaná celiakie; CLD-GFD - celiakie na bezlepkové dietě (GFD - gluten-free diet); T1D/INS - diabetes mellitus 1. typu s probíhající inzulinítidou; T1D - diabetes mellitus 1. typu s vyhaslou inzulinítidou; T2D - diabetes mellitus 2. typu; M - muži; Ž - ženy; Marsh - histologická klasifikace dle Marshe hodnotící stupeň poškození sliznice tenkého střeva; tTG - tkáňová transglutamináza; EMA - endomysální protilátky; GAD - glutamic acid decarboxylase; IA2 - islet antigen2; CRP - C-reaktivní protein. Fyziologická rozmezí: anti-tTG IgA Ab <12,00 IU/ml, anti-GAD <5,00 IU/ml, anti-IA2 <10,00 IU/ml, albumin (34,0-50,0 g/l), CRP <5,0 mg/l, celkové sérové hladiny IgG (6,80-14,45 g/l), IgA (0,71-3,74 g/l), IgM (0,40-2,48 g/l), IgE <100,0 IU/ml. Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka.

Testované skupiny	C	CLD	CLD-GFD	T1D/INS	T1D	T2D
Počet	41	43	12	20	20	30
Průměr věku (rozmezí věku)	39,4 (18 - 81)	30,8 (18 - 46)	41,2 (22 - 77)	53,5 (20 - 87)	47,1 (20 - 78)	66,3 (41 - 84)
Poměr pohlaví M/Ž	22/19	17/26	3/9	12/8	13/7	18/12
Histologie: Marsh	-	3a-c	-	-	-	-
Protilátky:						
anti-tTG IgA	0,6 ± 0,3	105,9 ± 2,75	2,7 ± 0,69	1,0 ± 0,24	3,0 ± 1,3	1,4 ± 0,3
EMA	negativní	pozitivní	negativní	negativní	negativní	negativní
anti-GAD	2,7 ± 2,1	1,4 ± 0,58	1,4 ± 1,1	120,8 ± 23,4	1,8 ± 0,5	1,2 ± 0,5
anti-IA2	2,0 ± 0,4	3,6 ± 1,5	0,9 ± 0,6	40,3 ± 20,1	0,7 ± 0,4	0,5 ± 0,5
Sérové hladiny:						
albumin	43,2 ± 0,3	42,4 ± 0,79	43 ± 1,1	36,9 ± 0,9	37,0 ± 1,0	39,2 ± 0,8
CRP	3,1 ± 0,6	5,0 ± 1,7	4,1 ± 1,1	15,7 ± 4,9	5,7 ± 2,0	5,1 ± 0,9
IgA	2,1 ± 0,1	2,4 ± 0,2	1,8 ± 0,2	2,6 ± 0,3	2,5 ± 0,2	3,1 ± 0,3
IgG	10,9 ± 0,3	11,6 ± 0,74	10,3 ± 0,9	11,4 ± 1,0	9,8 ± 0,9	9,4 ± 0,5
IgM	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1
IgE	63,8 ± 8,7	76,5 ± 35,9	131,0 ± 8,5	57,2 ± 15,9	106,6 ± 6,0	127,4 ± 49,9



#### 4.3.3. Popis experimentálních laboratorních vyšetření

V sérech pacientů a jedinců z kontrolní skupiny bylo provedeno stanovení hladin následujících markerů:

- 1) cytokeratin 18 caspase-cleaved fragmentu (cCK-18) soupravou M30-Apoptosense ELISA Kit (Peviva, Sweden)
- 2) intestinálního fatty acid binding proteinu (I-FABP) soupravou Human I-FABP ELISA Kit (Hycult Biotech Inc., US)
- 3) solubilního CD14 (sCD14) testem Human sCD14 ELISA Kit (Hycult Biotech Inc., US).

#### 4.3.4. Statistické zpracování

Pro statistické zpracování byl použit software STATISTICA 12 (Statsoft, USA).

Kontinuální proměnné jsou vyjádřeny jako střední hodnoty  $\pm$  směrodatné odchylky. Cut-off (prahové hodnoty, od kterých byl výsledek hodnocen jako pozitivní) pro sérové hladiny cCK-18, I-FABP a sCD14 byly vypočteny jako průměrná hodnota plus 2 směrodatné odchylky sérové hladiny příslušného testovaného markeru u 41 zdravých jedinců z kontrolní skupiny.

Pro srovnání sérových hladin testovaných markerů cCK-18, I-FABP a sCD14 v patientských skupinách a v kontrolní skupině byl z důvodu velké odlehlosti některých měření a důvodu nenormality dat použit neparametrický Mann-Whitneyův U test, který testuje, zda se liší mediány v rámci skupin. Metoda testuje nulovou hypotézu, že mezi oběma skupinami není rozdíl oproti alternativní hypotéze, že se obě skupiny významně liší. Za statisticky významnou byla považována hodnota signifikance  $p < 0,05$ . Mann-Whitneyův U test byl rovněž užit pro hodnocení vlivu hypolipidemické léčby na sérovou hladinu markeru sCD14 u pacientů skupiny T2D.

V případě hypotézy č. 2 a hypotézy č. 3 byly závislosti mezi sledovanými parametry posouzeny pomocí Pearsonových korelačních koeficientů uspořádaných do korelační matice. Stejný přístup byl rovněž použit při hodnocení korelace hladiny protilátek anti-t-TG IgA s markery cCK-18, I-FABP a sCD14. V korelačních maticích je první číslo korelační koeficient  $r$ .

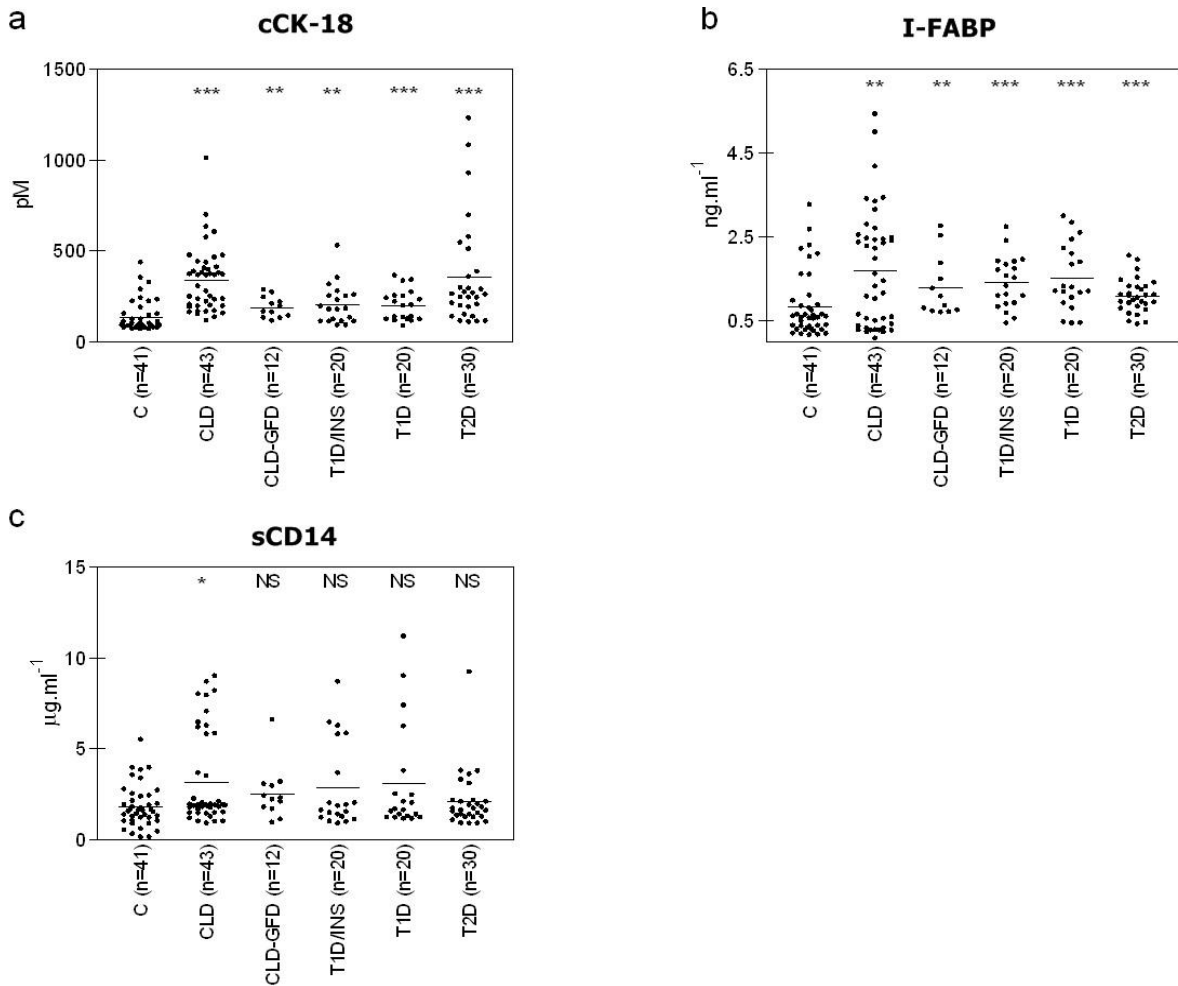
Druhé číslo p je signifikance (významnost) testu, který ověřuje nulovou hypotézu, že mezi danými parametry neexistuje závislost oproti alternativní hypotéze, že jsou závislé. Za statisticky významnou byla považována hodnota  $p < 0,05$ . Grafické znázornění sledovaných závislostí bylo provedeno pomocí bodových grafů (scatter plots) s proložením lineární regresní funkcí.

Statistická analýza byla provedena statistikem se zkušeností v biomedicínské statistice.

#### **4.4. Výsledky**

Hladina markerů cytokeratin 18 caspase-cleaved fragmentu (cCK-18), intestinal fatty acid-binding proteinu (I-FABP) a solubilního CD14 (sCD14) byla testována u 166 dospělých jedinců, zahrnujících zdravou kontrolní skupinu (C) a 5 patientských skupin: s recentně diagnostikovanou (neléčenou) celiakií (CLD), s celiakií léčenou bezlepkovou dietou (CLD-GFD), s diabetes mellitus 1. typu s probíhající inzulinídií (T1D/INS), s diabetes mellitus 1. typu s vyhaslou inzulinídií (T1D) a s diabetes mellitus 2. typu (T2D). Obrázek 5 a, b, c dokumentuje individuální distribuci sérových hladin testovaných markerů u jednotlivých skupin.

**Obrázek 5.** Distribuce sérových hladin cCK-18 (a), I-FABP (b) a sCD14 (c) u kontrolní skupiny (C), u pacientů s CLD, CLD-GFD, T1D/INS, T1D a T2D. Vodorovné linie představují průměrnou hodnotu; „n“, počet pacientů a zdravých jedinců z kontrolní skupiny. Ke statistickému porovnání hladin sledovaných markerů u testovaných patientských skupin se zdravými kontrolami (C) byl použit Mann-Whitney U test: \*\*\* (hladina významnosti  $p < 0,001$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ), NS (statisticky nevýznamný rozdíl).



Tabulka 3 ukazuje průměrné sérové hladiny testovaných markerů u kontrolní skupiny a patientských skupin a statistické hodnocení.

**Tabulka 3.** Srovnání sérových hladin cCK-18, I-FABP a sCD14 u zdravých kontrol (C) a u pacientů s CLD, CLD-GFD, T1D/INS, T1D a T2D. Uvedené jednotky: cCK-18 (pM, tj. pmol.l<sup>-1</sup>); I-FABP (ng.ml<sup>-1</sup>); sCD14 (μg.ml<sup>-1</sup>). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka. Ke statistickému hodnocení sérových hladin sledovaných markerů byl využit Mann-Whitney U test; p - hladina statistické významnosti.

Marker	C	CLD	CLD-GFD	T1D/INS	T1D	T2D
cCK-18	137,2 ± 86,3	339,3 ± 178,4	189,3 ± 57,1	204,1 ± 109,5	200,5 ± 84,3	355,4 ± 287,5
	-	p<0,001	p<0,01	p<0,01	p<0,001	p<0,001
I-FABP	0,8 ± 0,7	1,7 ± 1,4	1,3 ± 0,7	1,4 ± 0,7	1,5 ± 0,8	1,1 ± 0,4
	-	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,001	p<0,001
sCD14	1,8 ± 1,2	3,2 ± 2,5	2,5 ± 1,5	2,6 ± 2,4	3,1 ± 3,0	2,1 ± 1,6
	-	p<0,05	NS	NS	NS	NS

Tabulka 4 vyjadřuje četnost osob séropozitivních pro cCK-18, I-FABP a sCD14 u kontrolní skupiny (C) a u testovaných patientských skupin. Za séropozitivní byly považovány hodnoty překračující prahovou hodnotu (cut-off) pro stanovované markery, což odpovídá sérové koncentraci 310 pM pro cCK-18, 2,2 ng.ml<sup>-1</sup> pro I-FABP a 4,2 μg.ml<sup>-1</sup> pro sCD14. Cut-off hodnoty byly kalkulovány jako průměrná hodnota plus 2 směrodatné odchylky ze sérové hladiny individuálních markerů testovaných u 41 zdravých jedinců z kontrolní skupiny.

**Tabulka 4.** Četnost séropozitivity cCK-18, I-FABP and sCD14 u kontrolní skupiny (C) a u pacientů s CLD, CLD-GFD, T1D/INS, T1D a T2D.

Marker	C	CLD	CLD-GFD	T1D/INS	T1D	T2D
cCK-18	3/41 (7,3 %)	22/43 (51,1 %)	0/12 (0 %)	3/20 (15 %)	3/20 (15 %)	9/30 (30 %)
I-FABP	3/41 (7,3 %)	19/43 (44,2 %)	2/12 (16,7 %)	2/20 (10 %)	5/20 (25 %)	0/30 (0 %)
sCD14	1/41 (2,4 %)	11/43 (25,6 %)	1/12 (8,3 %)	5/20 (25 %)	4/20 (20 %)	1/30 (3,3 %)

Při abdominálním ultrasonografickém vyšetření jsme prokázali ve skupině 30 -ti pacientů s T2D přítomnost jaterní steatózy ve 26 případech. V ostatních patientských skupinách a v kontrolní skupině byl sonografický nález na játrech v normě.

**4.4.1. Hypotéza 1: A)** Je u diabetes mellitus 1. typu a 2. typu prokazatelné poškození epitelové bariéry tenkého střeva? **B)** Je toto poškození odlišné od charakteru poškození u celiakie?

Ve srovnání s kontrolní skupinou (obrázek 5) jsme našli statisticky signifikantně zvýšené hladiny cCK-18 a I-FABP u pacientů s diabetes mellitus 1. typu s probíhající inzulinítidou (T1D/INS) ( $p < 0,01$ , resp.  $p < 0,001$ ), s diabetes mellitus 1. typu s vyhaslou inzulinítidou (T1D) ( $p < 0,001$ , resp.  $p < 0,001$ ) a s diabetes mellitus 2. typu (T2D) ( $p < 0,001$ , resp.  $p < 0,001$ ).

V případě pacientů s diabetes mellitus 1. typu nebyly nalezeny statisticky signifikantní rozdíly v průměrech hladin cCK-18, I-FABP a sCD14 mezi pacienty s probíhající (T1D/INS) a s vyhaslou (T1D) inzulinítidou (obrázek 5, tabulka 3).

Byly však nalezeny určité odlišnosti v testovaných markerech mezi skupinou diabetes mellitus 1. typu (bez ohledu na stav inzulinítidy) a diabetes mellitus 2. typu. Zejména je pozoruhodné, že u pacientů s diabetes mellitus 2. typu (T2D) byly sérové hladiny cCK-18 vysoké ( $355,4 \pm 287,5$  pM) (tabulka 3) a dosahovaly přibližně hodnot jako u skupiny pacientů s neléčenou celiakií (CLD); dokonce u 9 ze 30-ti pacientů s T2D překročily sérové hladiny hodnotu cut-off (tj. séropozitivitu) pro tento marker (tabulka 4). Všichni séropozitivní pacienti pro marker cCK-18 měli při ultrasonografickém vyšetření jater detekovaný vysoký stupeň jaterní steatózy.

Ve srovnání s pacienty s diabetes mellitus 2. typu (T2D) byla průměrná hladina cCK-18 u pacientů s diabetes mellitus 1. typu s probíhající inzulinítidou (T1D/INS) a s vyhaslou inzulinítidou (T1D) nižší:  $204,1 \pm 109,5$  pM a  $200,5 \pm 84,3$  pM (tabulka 3). Četnost séropozitivity cCK-18 u pacientů s diabetes mellitus 1. typu byla nízká (3/20 u T1D/INS a 3/20 u T1D) ve srovnání se séropozitivitou tohoto markeru u diabetes 2. typu (9/30) (tabulka 4).

Rovněž frekvence séropozitivity markerů I-FABP a sCD14 byla ve všech skupinách diabetes mellitus relativně nízká (tabulka 4).

U pacientů s neléčenou celiakií (CLD) byly ve srovnání s kontrolní skupinou (C) statisticky signifikantně zvýšeny všechny serologické markery: cCK-18 ( $p < 0,001$ ), I-FABP ( $p < 0,01$ ) a sCD14 ( $p < 0,05$ ) (obrázek 5). Ve srovnání s ostatními patientskými skupinami dosahovaly sérové hladiny testovaných makerů u CLD pacientů nejvyšších hodnot: cCK-18 ( $339,3 \pm 178,4$  pM; průměr  $\pm$  SD), I-FABP ( $1,7 \pm 1,4$  ng.ml<sup>-1</sup>), sCD14 ( $3,2 \pm 2,5$  μg.ml<sup>-1</sup>) (tabulka 3) a zároveň největší četnosti séropozitivity: cCK-18 (22/43; 51,5 %), I-FABP (19/43; 44,2 %) a sCD14 (11/43; 25,6 %) (tabulka 4).

Průměrné sérové hladiny všech tří markerů u kontrolní skupiny (C) byly ze všech testovaných skupin nejnižší: cCK-18 ( $137,2 \pm 86,3$  pM), I-FABP ( $0,8 \pm 0,7$  ng.ml<sup>-1</sup>) a sCD14 ( $1,8 \pm 1,2$  μg.ml<sup>-1</sup>) (tabulka 3) a v rámci všech testovaných patientských skupin dosahovaly nejnižší četnosti séropozitivity: cCK-18 (3/41; 7,3 %), I-FABP (3/41; 7,3 %) a sCD14 (1/41; 2,4 %) (tabulka 4).

**4.4.2. Hypotéza 2:** Koreluje poškození epitelové bariéry tenkého střeva u diabetes mellitus 1. typu s:

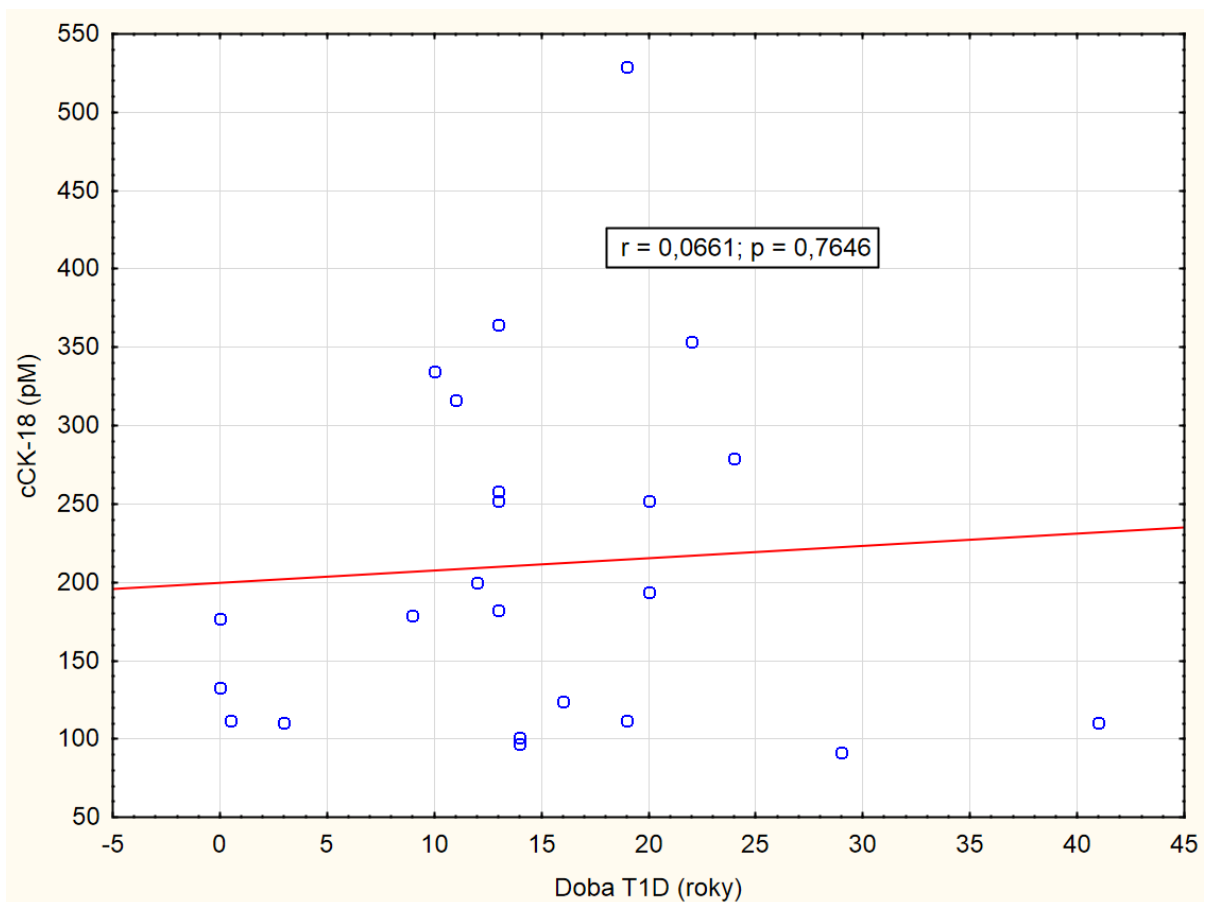
A) délkou trvání diabetes mellitus?

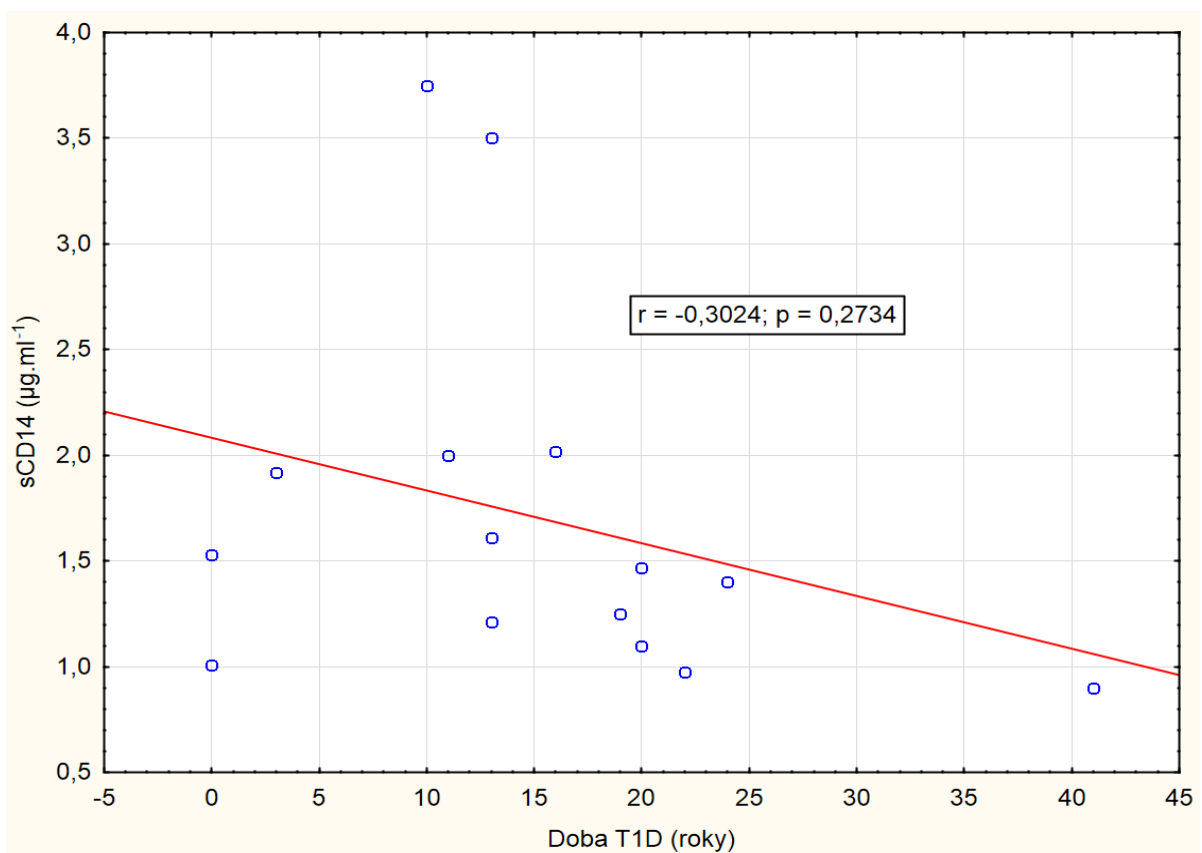
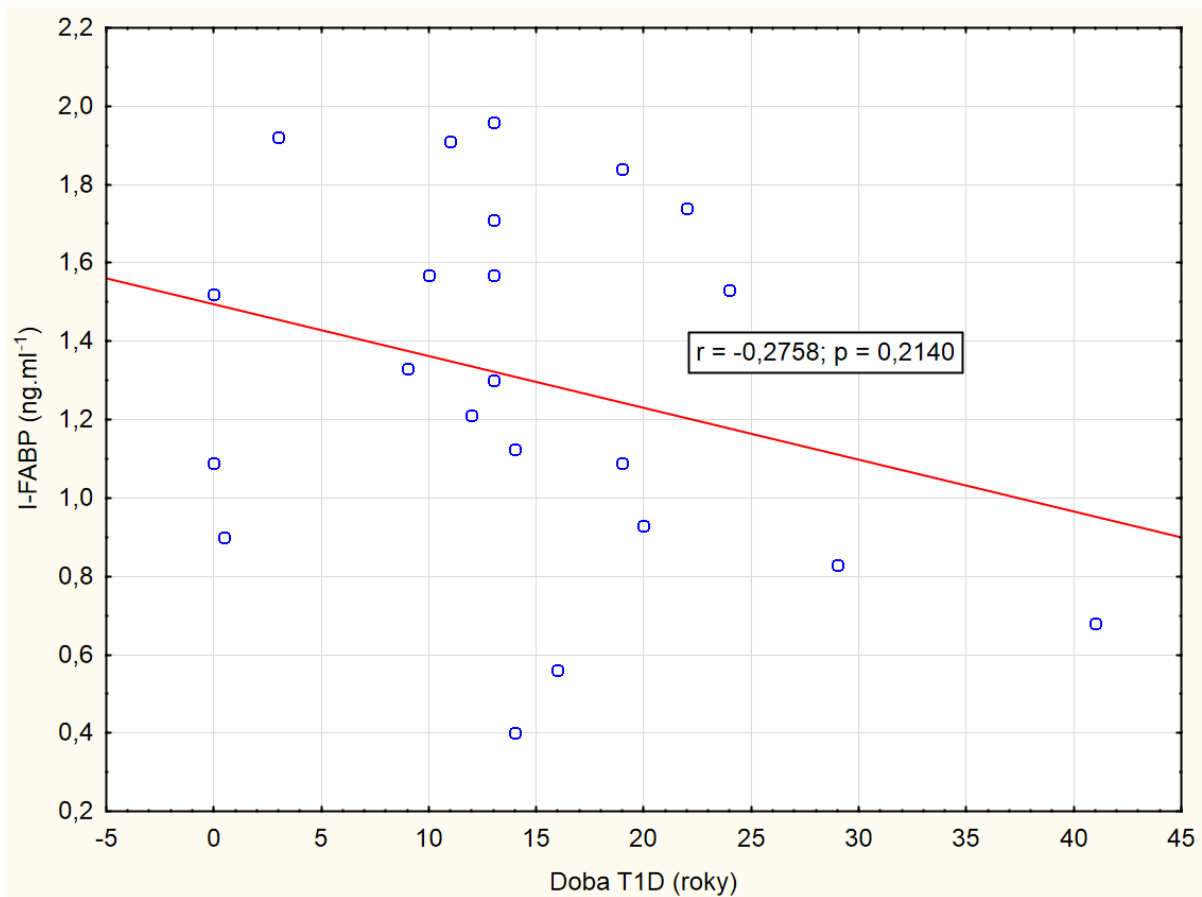
B) parametrem kompenzace diabetes mellitus, tj. hladinou glykosylovaného hemoglobinu?

Délka trvání diabetes mellitus (doba T1D) je uváděna v rocích, hladina glykosylovaného hemoglobinu (HbA1c) v mmol/mol.

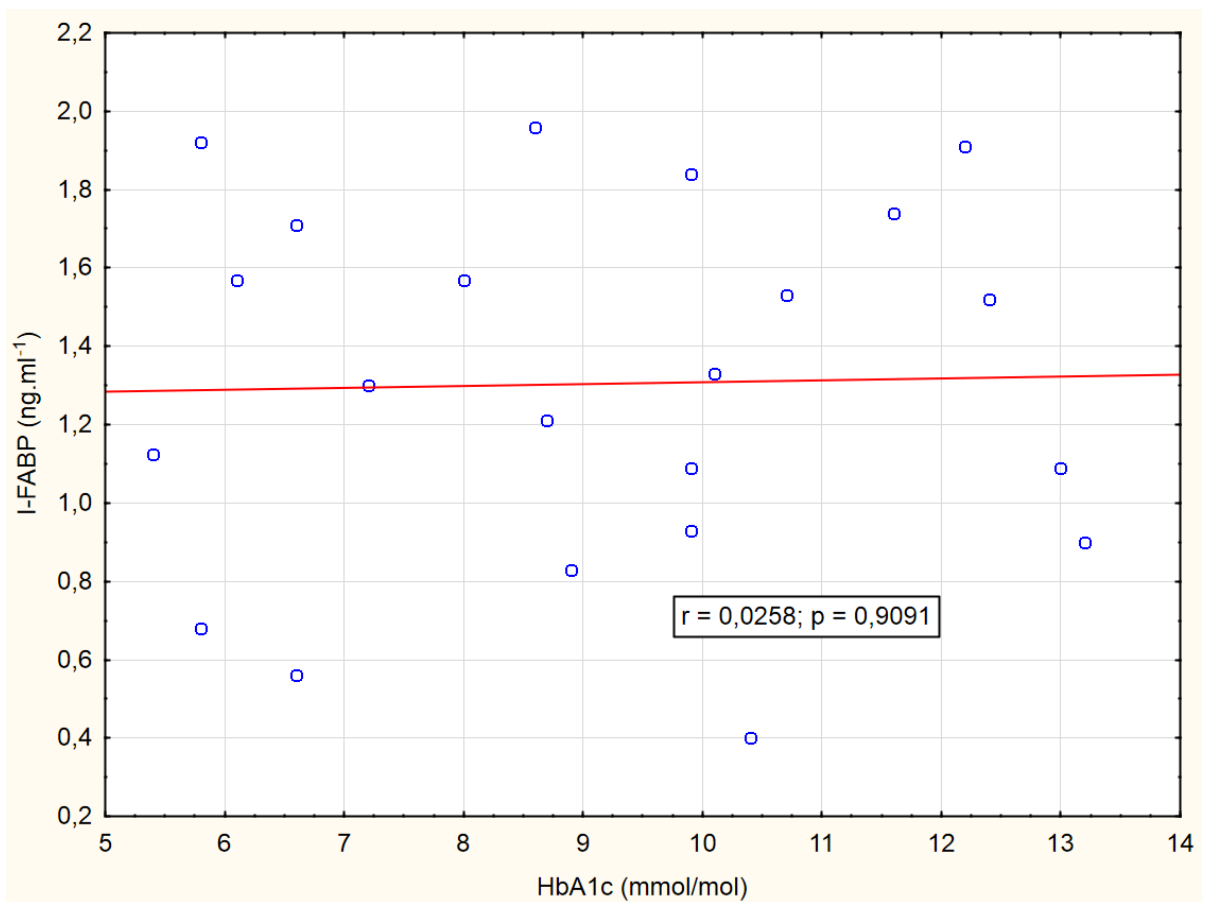
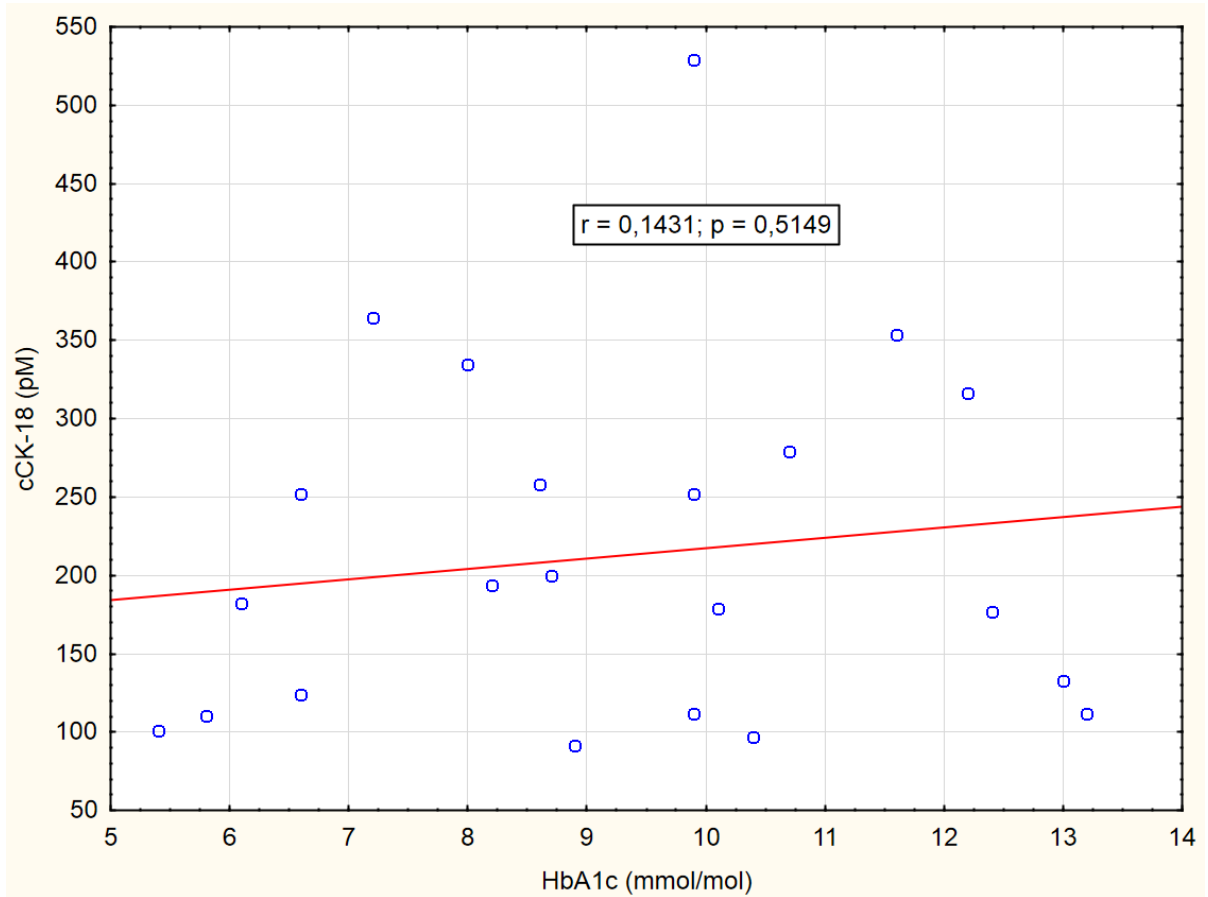
V případě diabetes mellitus 1. typu s probíhající inzulinídiou (T1D/INS) z níže uvedené korelační matice a příslušných bodových grafů vyplývá, že statisticky významná závislost nebyla zjištěna mezi žádným z testovaných markerů (cCK-18, I-FABP, sCD14) a žádnou z dvojice parametrů doba T1D a HbA1c.

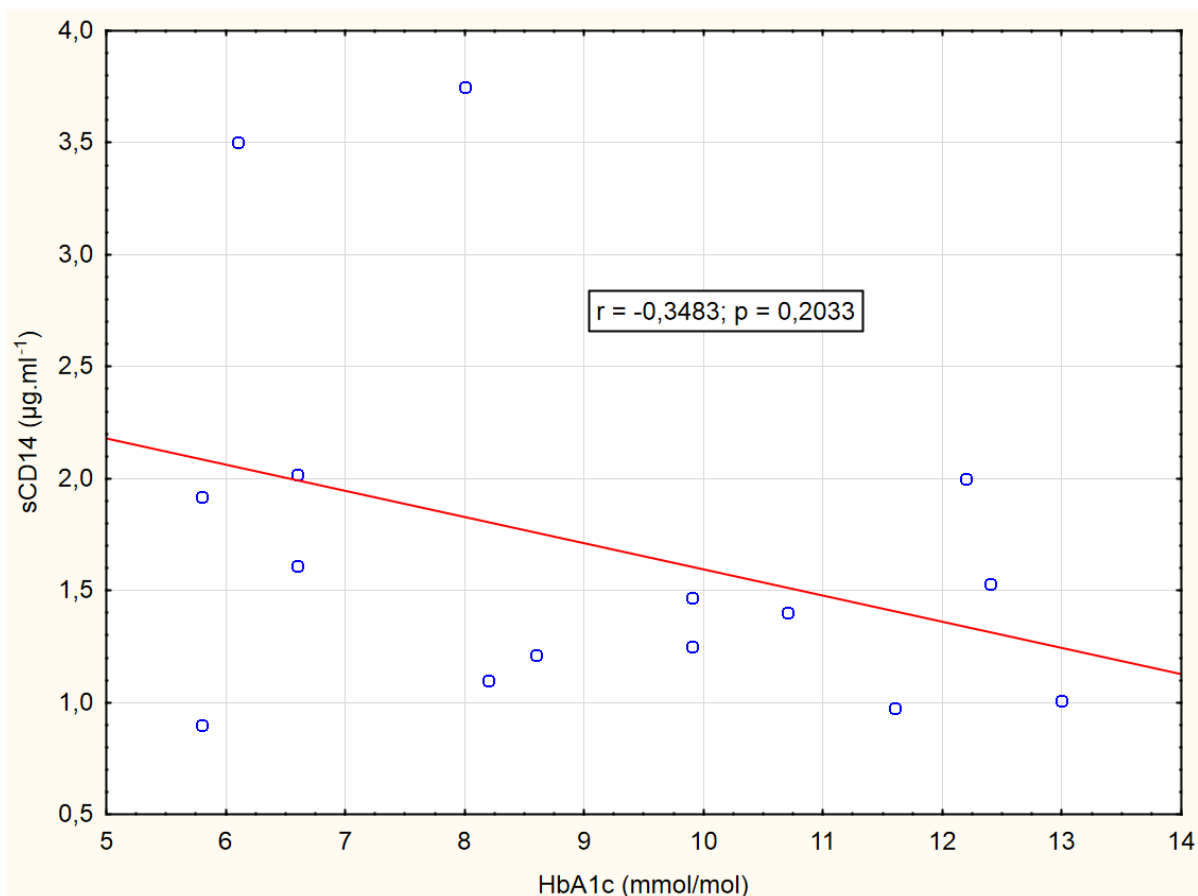
Proměnná	Korelace (Data T1D/INS)				
	Označ. korelace jsou významné na hlad. $p < ,05000$				
	Doba T1D (roky)	HbA1c (mmol/mol)	cCK-18 (pM)	I-FABP (ng.ml-1)	sCD14 (µg.ml-1)
Doba T1D (roky)	1,0000	-,3449	,0661	-,2758	-,3024
	$p=---$	$p=,107$	$p=,765$	$p=,214$	$p=,273$
HbA1c (mmol/mol)	-,3449	1,0000	,1431	,0258	-,3483
	$p=,107$	$p=---$	$p=,515$	$p=,909$	$p=,203$
cCK-18 (pM)	,0661	,1431	1,0000	,3332	,2124
	$p=,765$	$p=,515$	$p=---$	$p=,130$	$p=,447$
I-FABP (ng.ml-1)	-,2758	,0258	,3332	1,0000	,1315
	$p=,214$	$p=,909$	$p=,130$	$p=---$	$p=,654$
sCD14 (µg.ml-1)	-,3024	-,3483	,2124	,1315	1,0000
	$p=,273$	$p=,203$	$p=,447$	$p=,654$	$p=---$





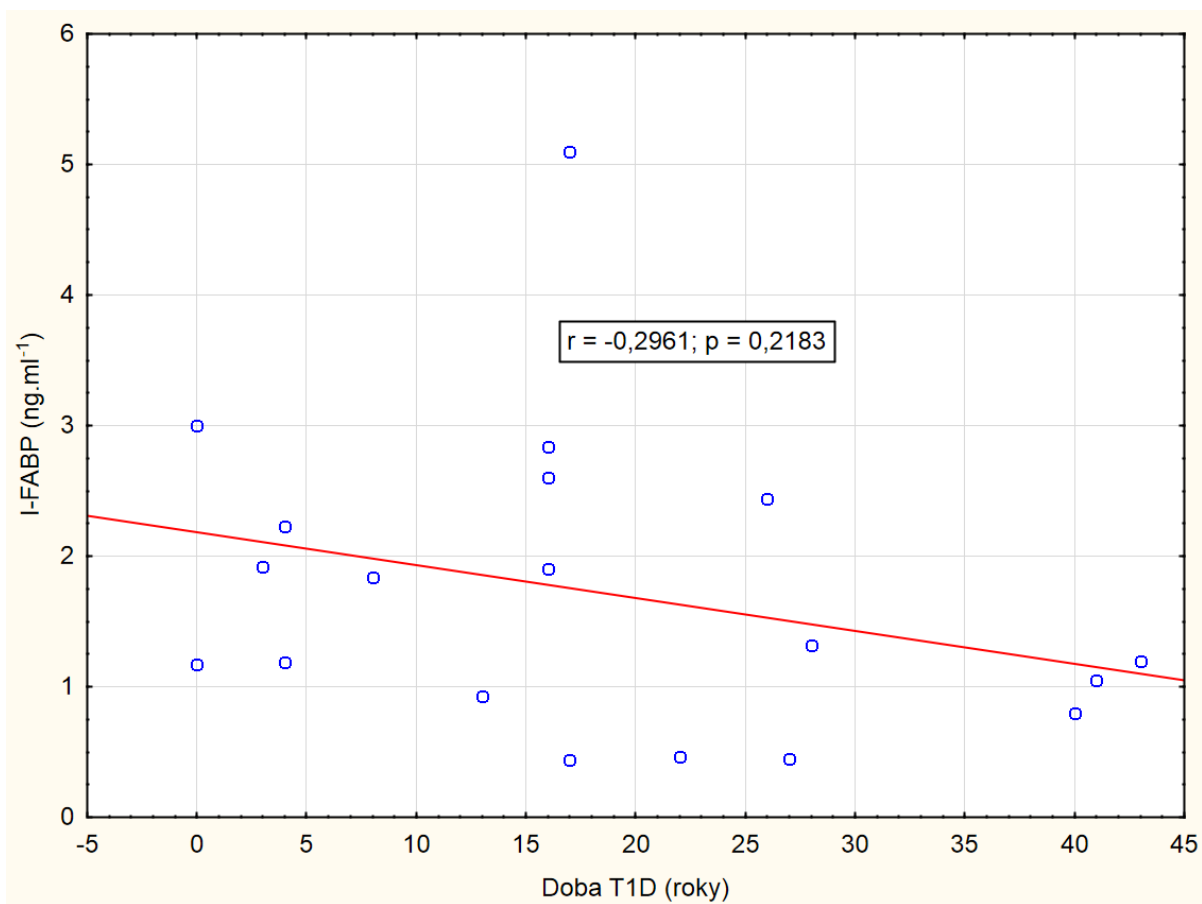
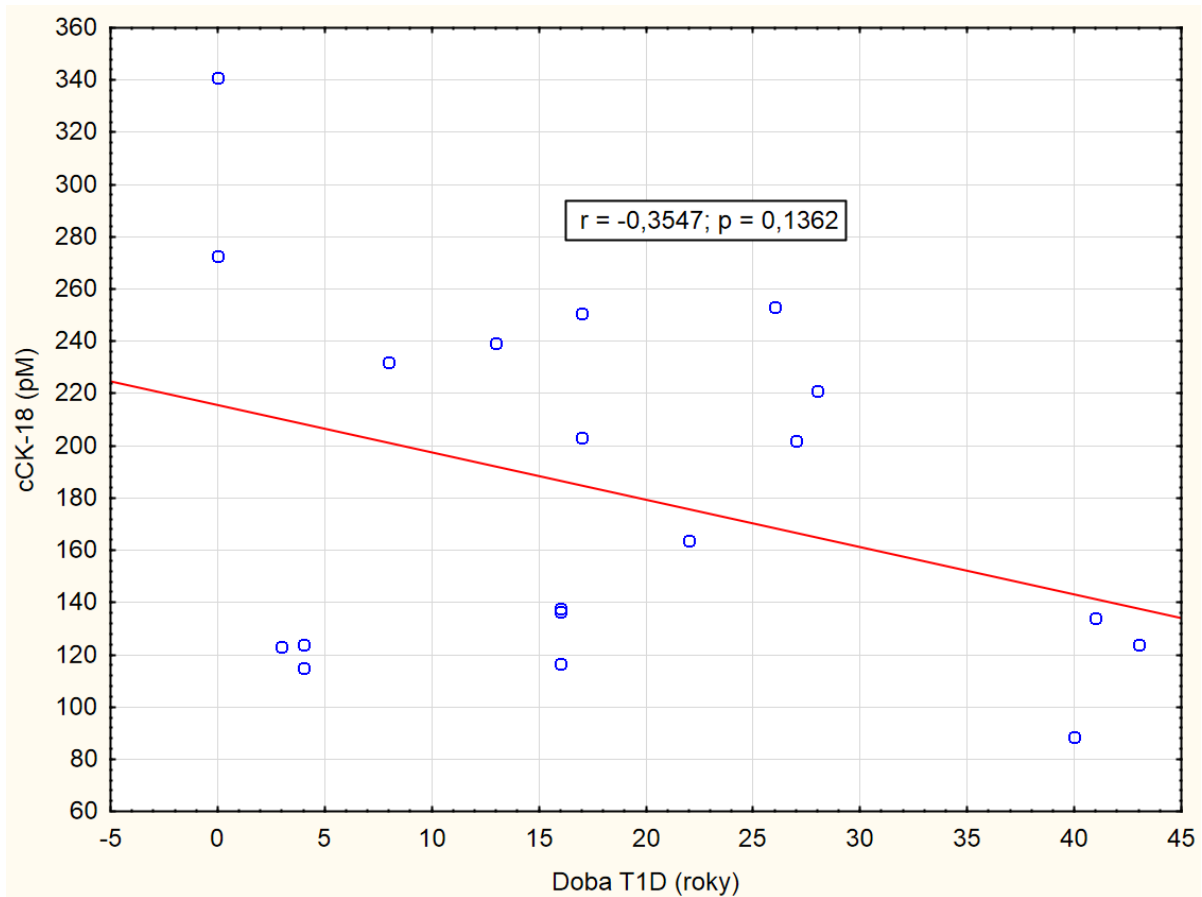


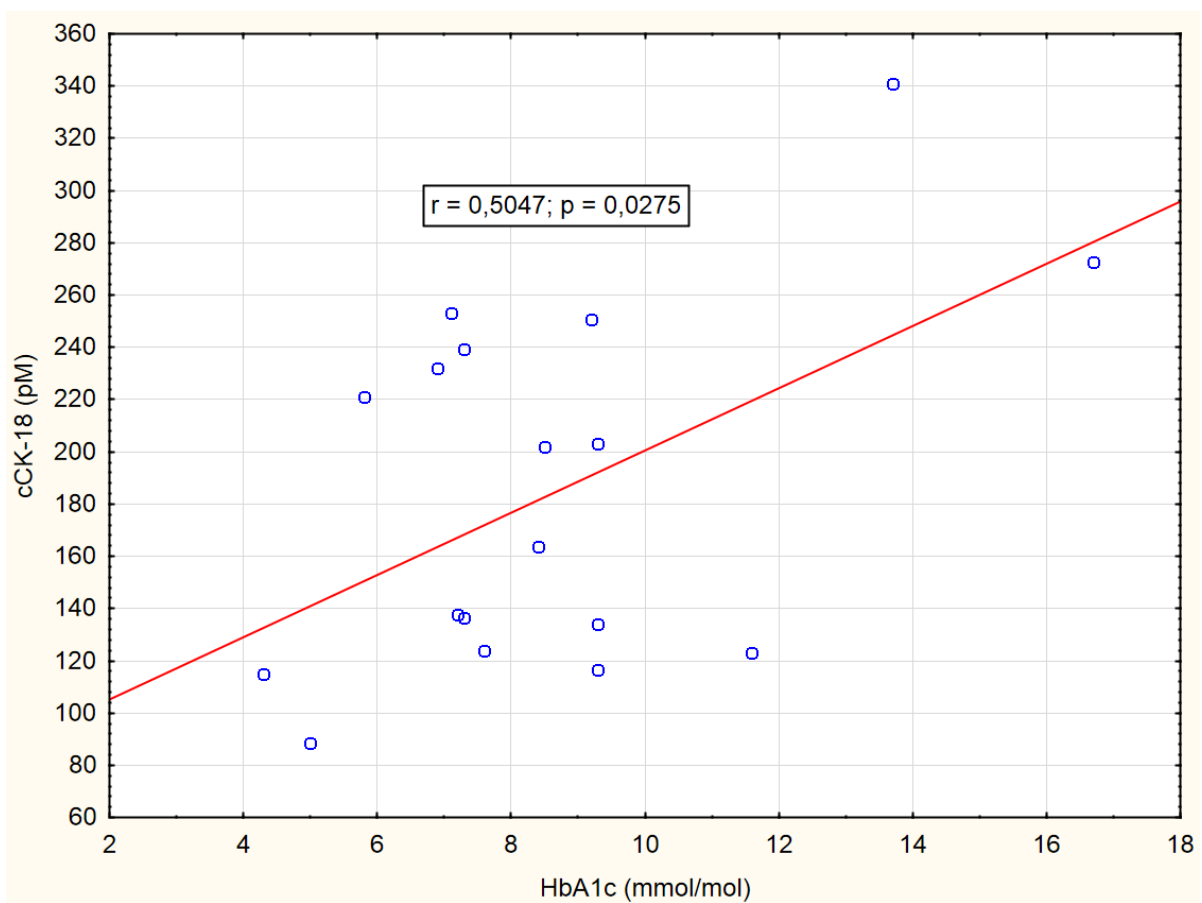
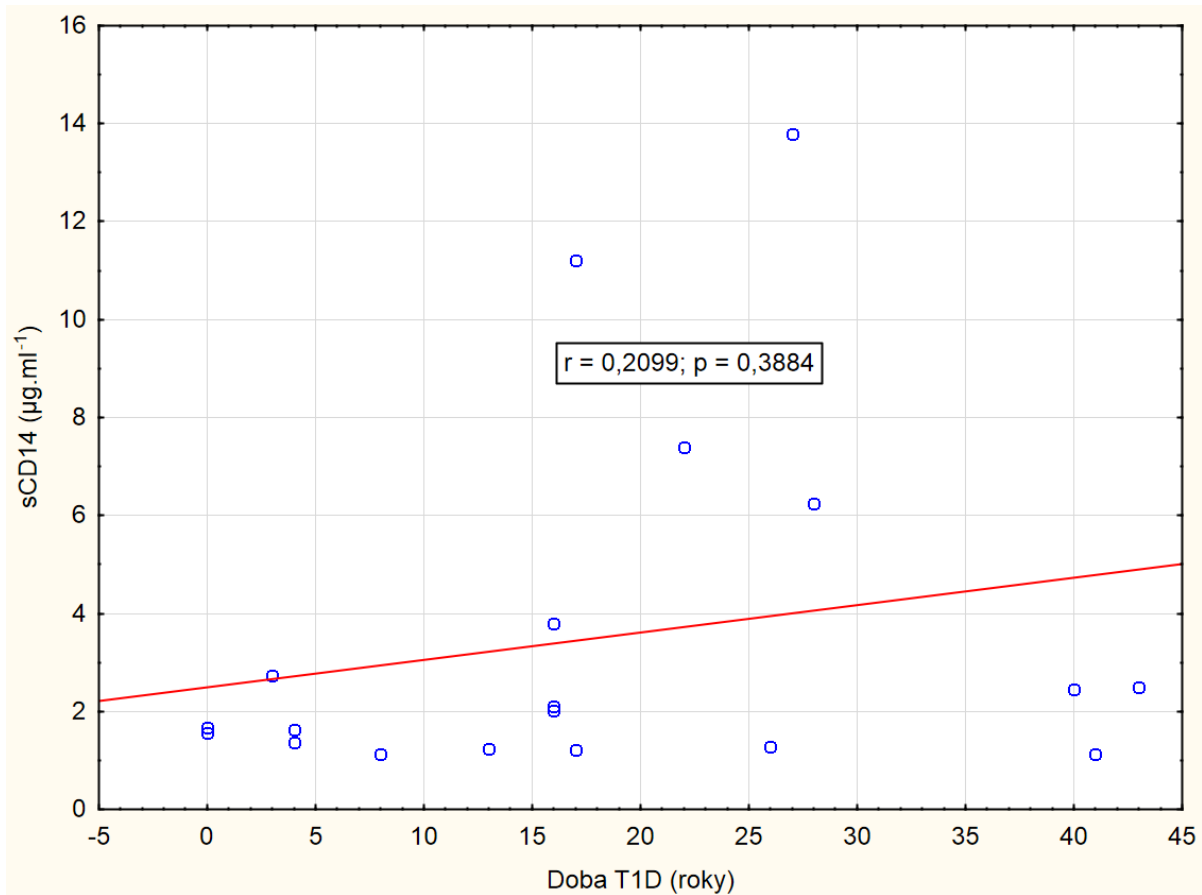


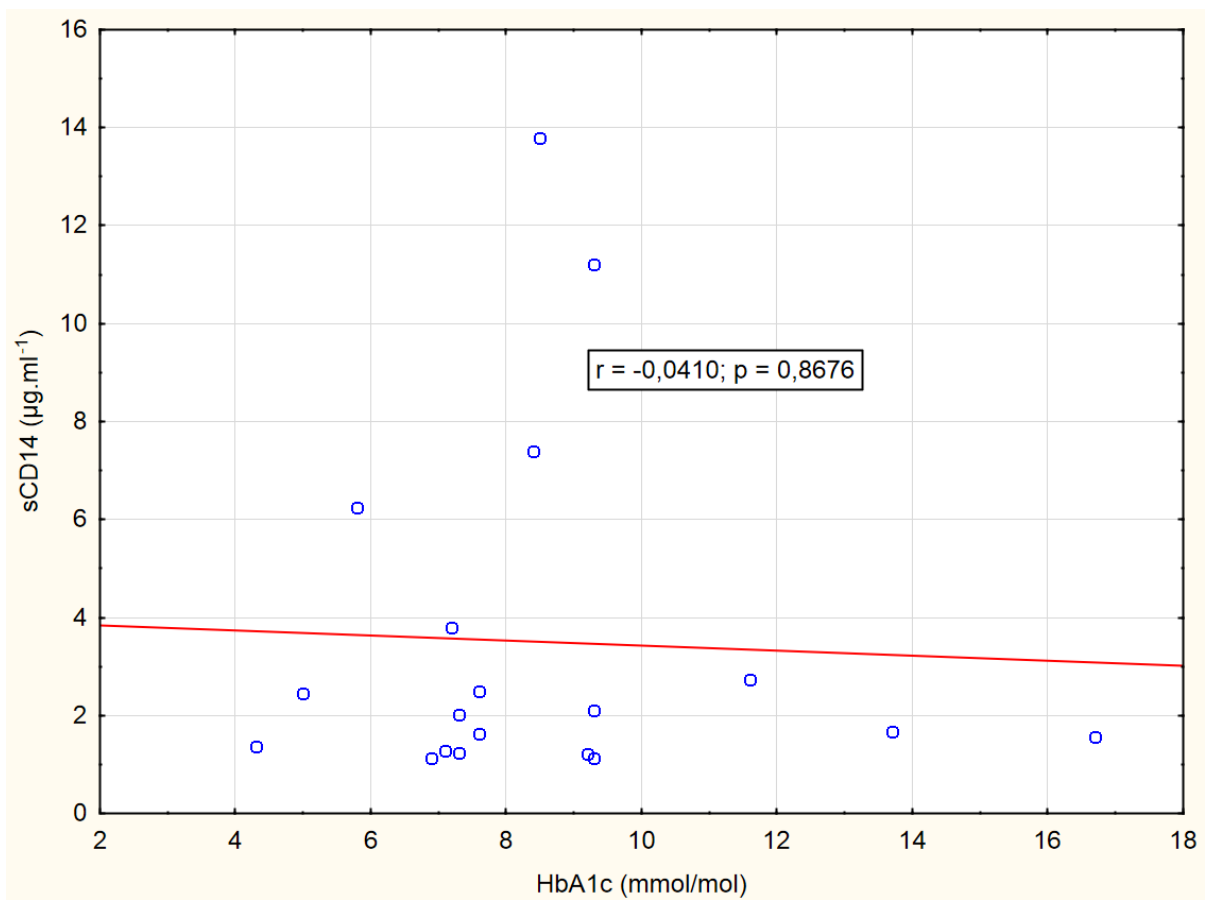
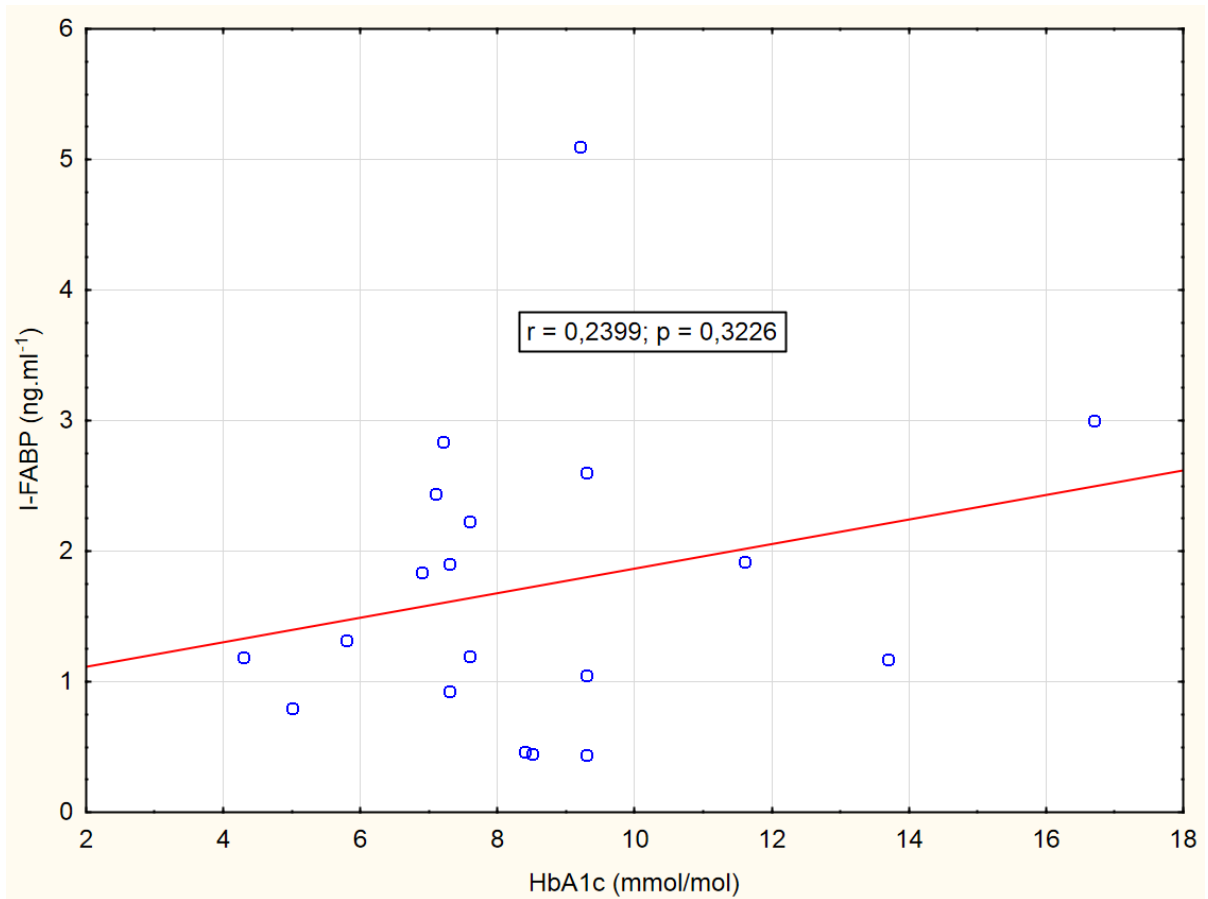


V případě pacientů s diabetes mellitus 1. typu s vyhaslou inzuliníídou (T1D) z níže uvedené korelační matice a příslušných bodových grafů vyplývá, že statisticky významná pozitivní závislost byla zjištěna pouze mezi parametry cCK-18 a HbA1c ( $r = 0,5047$ ,  $p = 0,028$ ).

Proměnná	Korelace (Data T1D vyhaslá) Označ. korelace jsou významné na hlad. $p < ,05000$				
	Doba T1D (roky)	HbA1c (mmol/mol)	cCK-18 (pM)	I-FABP (ng.ml-1)	sCD14 (µg.ml-1)
Doba T1D (roky)	1,0000	-,4373	-,3547	-,2961	,2099
	$p=---$	$p=,061$	$p=,136$	$p=,218$	$p=,388$
HbA1c (mmol/mol)	-,4373	1,0000	,5047	,2399	-,0410
	$p=,061$	$p=---$	$p=,028$	$p=,323$	$p=,868$
cCK-18 (pM)	-,3547	,5047	1,0000	,1778	,0194
	$p=,136$	$p=,028$	$p=---$	$p=,467$	$p=,937$
I-FABP (ng.ml-1)	-,2961	,2399	,1778	1,0000	-,4842
	$p=,218$	$p=,323$	$p=,467$	$p=---$	$p=,036$
sCD14 (µg.ml-1)	,2099	-,0410	,0194	-,4842	1,0000
	$p=,388$	$p=,868$	$p=,937$	$p=,036$	$p=---$







#### 4.4.3. Hypotéza 3: Koreluje poškození epitelové bariéry tenkého střeva u diabetes mellitus 2.

typu s:

A) délkou trvání diabetes mellitus?

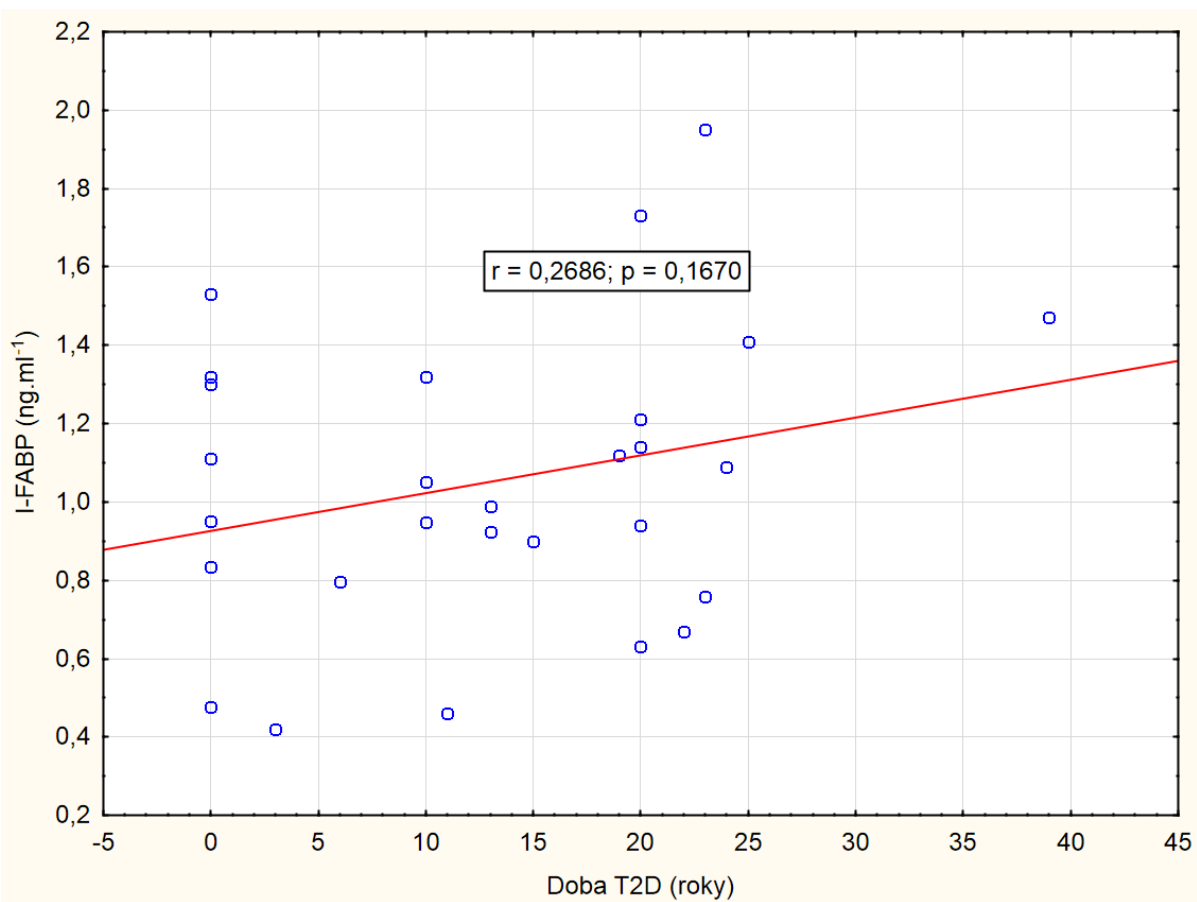
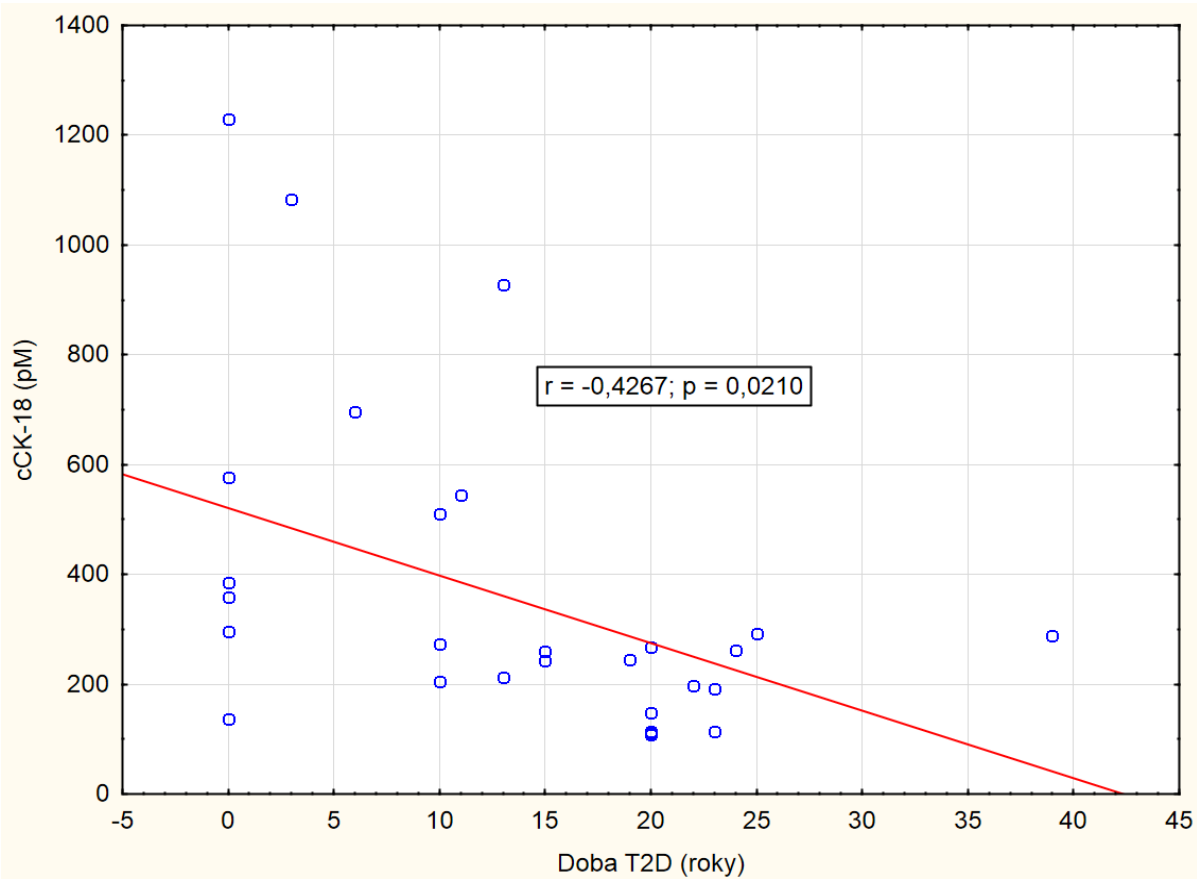
B) parametrem kompenzace diabetes mellitus, tj. hladinou glykosylovaného hemoglobinu?

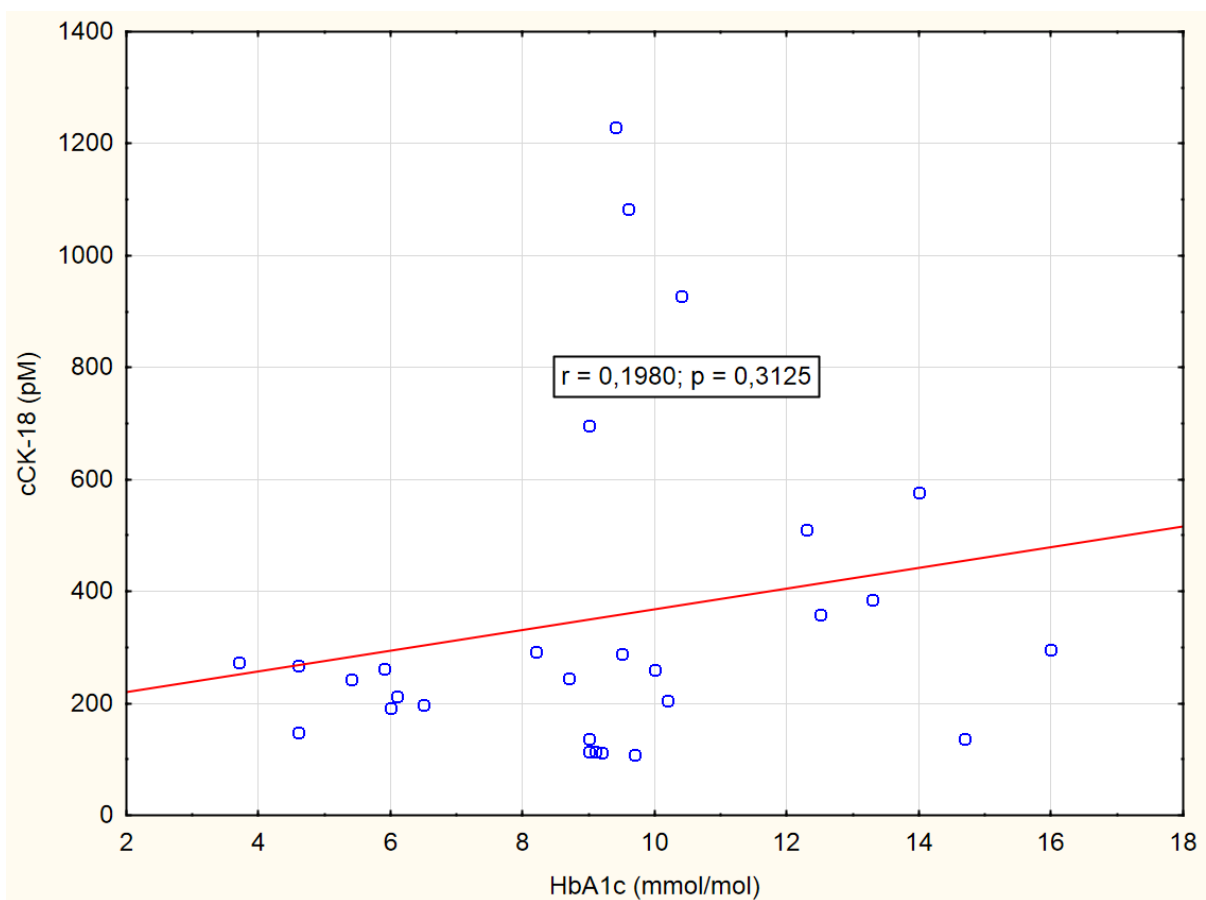
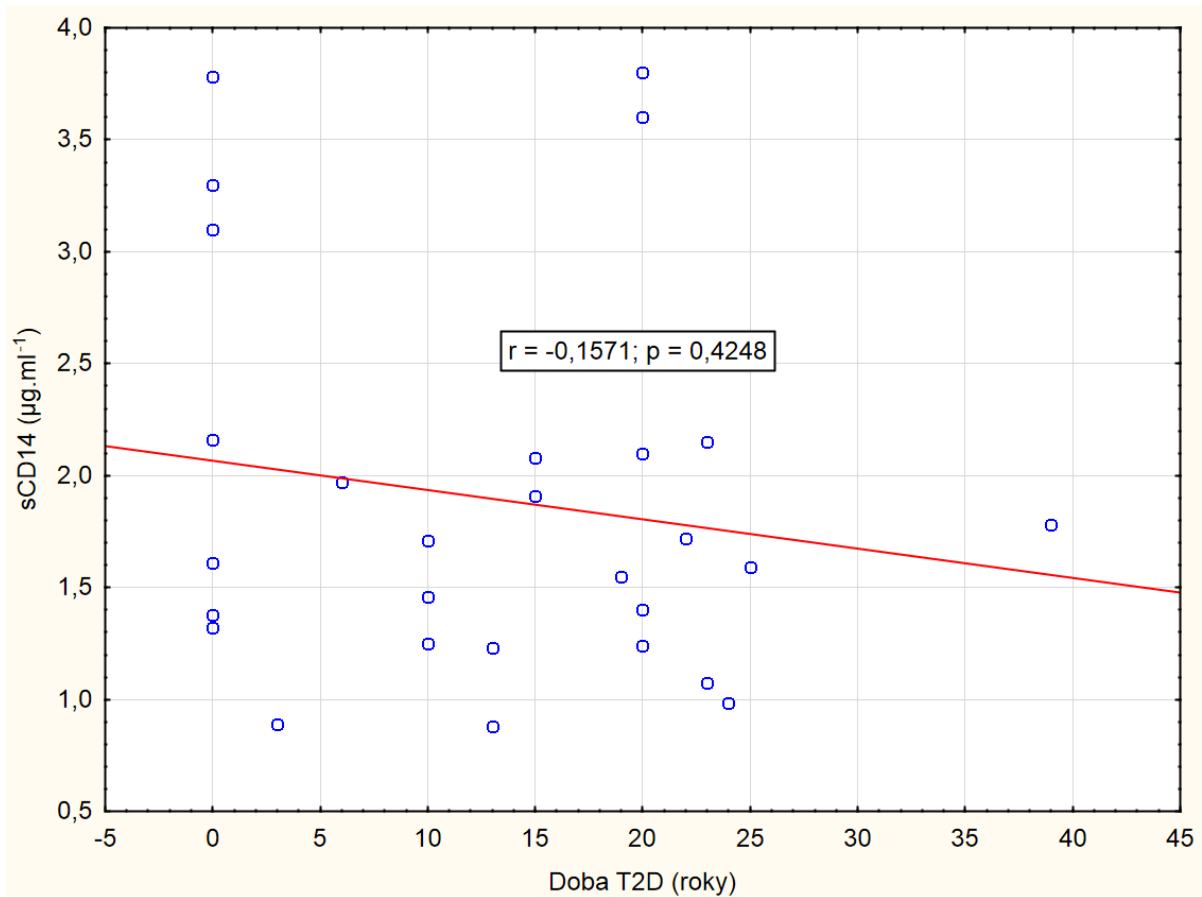
C) body mass indexem?

Délka trvání diabetes mellitus (doba T2D) je uváděna v rocích, hladina glykosylovaného hemoglobinu (HbA1c) v mmol/mol, body mass index (BMI) v kg.m<sup>-2</sup>.

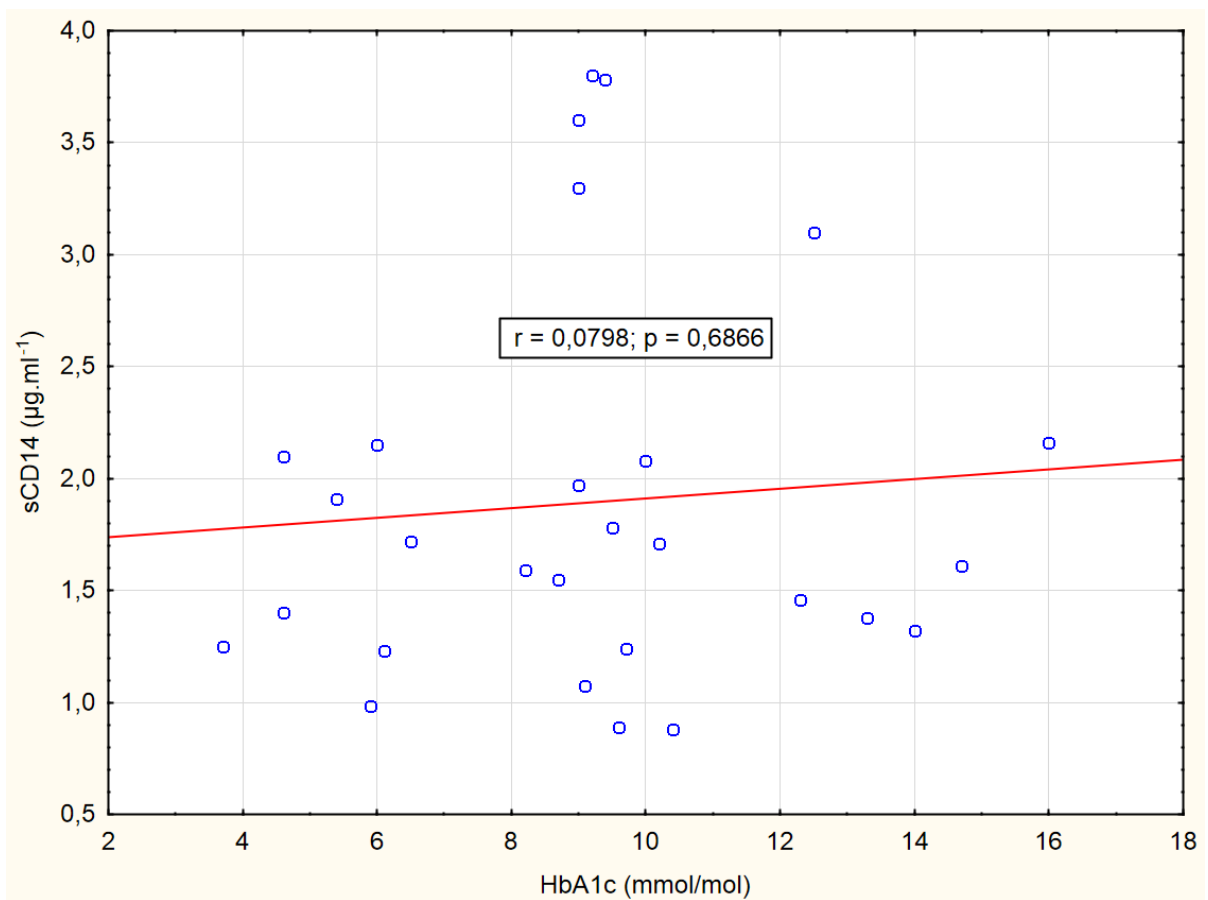
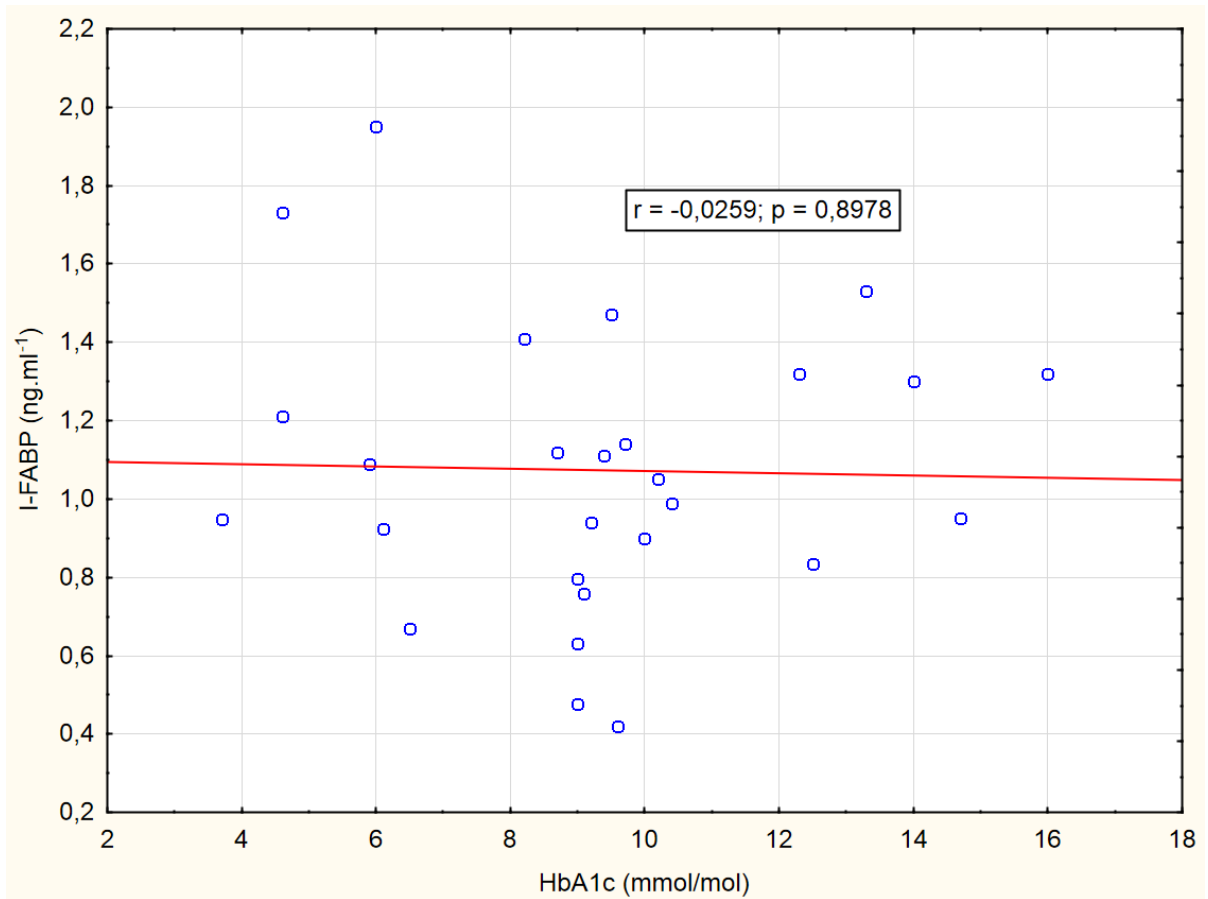
V případě diabetes mellitus 2. typu (T2D) z níže uvedené korelační matice a příslušných bodových grafů vyplývá, že pouze mezi parametry cCK-18 a dobou T2D ( $r = -0,4267$ ,  $p = 0,021$ ) byla zjištěna statisticky významná negativní závislost.

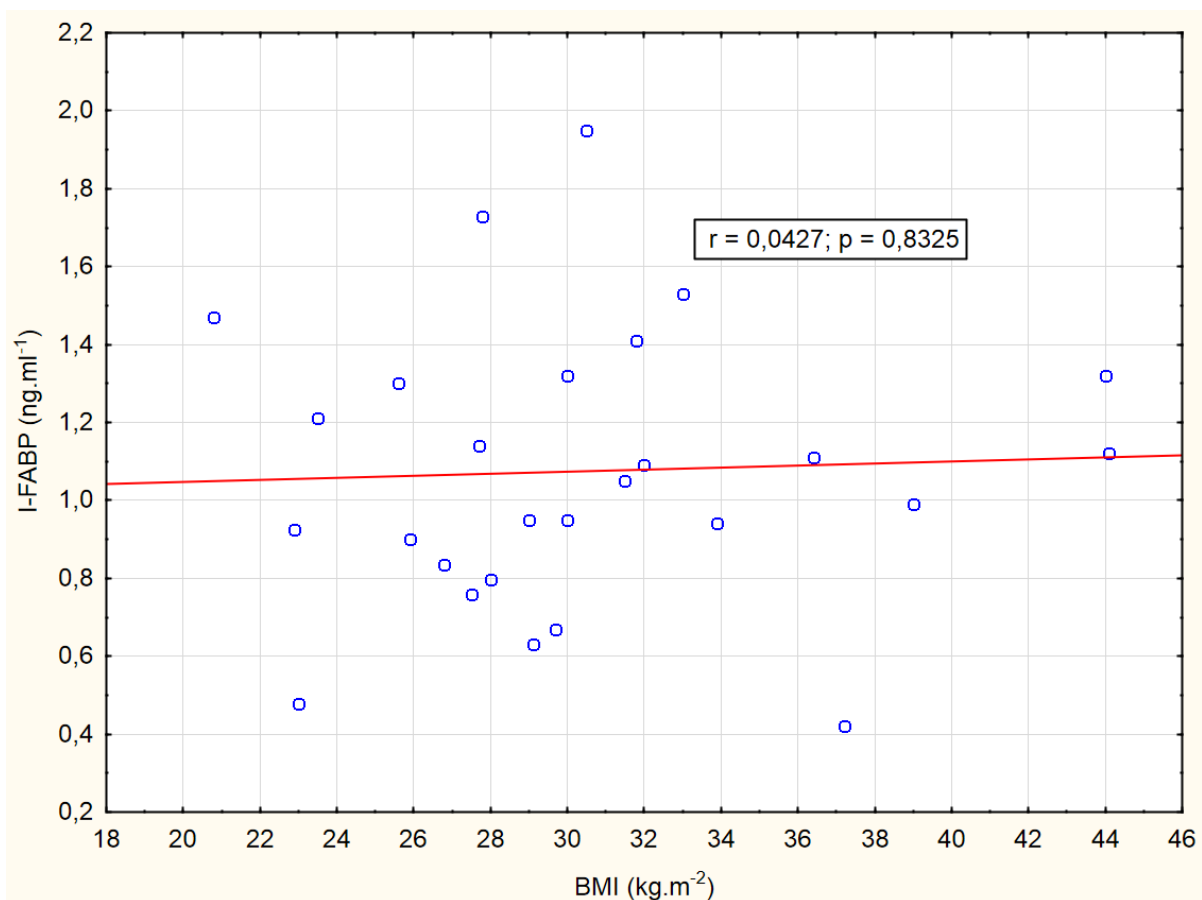
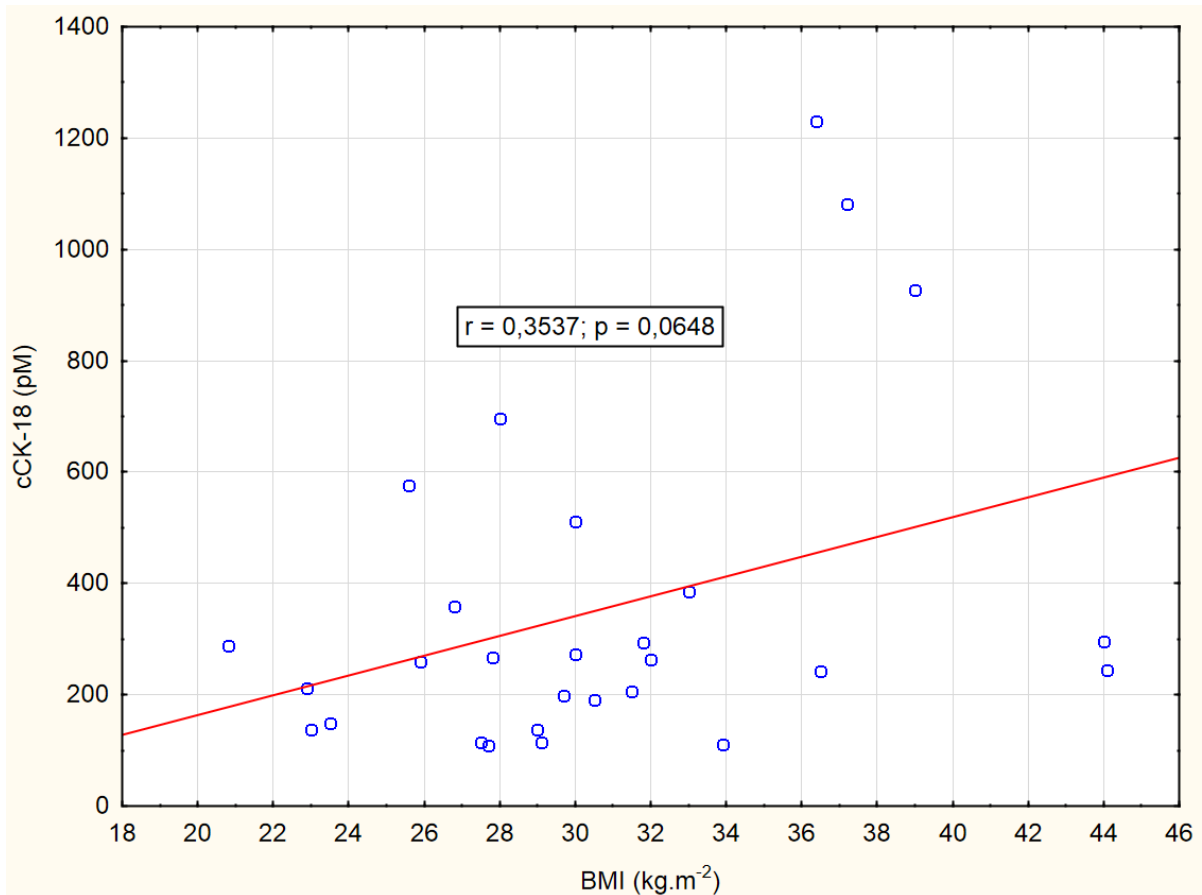
Proměnná	Korelace (Data T2D)					
	Označ. korelace jsou významné na hlad. $p < ,05000$					
	Doba T2D (roky)	HbA1c (mmol/mol)	BMI (kg.m-2)	cCK-18 (pM)	I-FABP (ng.ml-1)	sCD14 (µg.ml-1)
Doba T2D (roky)	1,0000	-,5552	-,2159	-,4267	,2686	-,1571
	p= ---	p=,002	p=,270	p=,021	p=,167	p=,425
HbA1c (mmol/mol)	-,5552	1,0000	,2079	,1980	-,0259	,0798
	p=,002	p= ---	p=,288	p=,313	p=,898	p=,687
BMI (kg.m-2)	-,2159	,2079	1,0000	,3537	,0427	-,0231
	p=,270	p=,288	p= ---	p=,065	p=,833	p=,907
cCK-18 (pM)	-,4267	,1980	,3537	1,0000	-,1425	-,0358
	p=,021	p=,313	p=,065	p= ---	p=,470	p=,857
I-FABP (ng.ml-1)	,2686	-,0259	,0427	-,1425	1,0000	-,1426
	p=,167	p=,898	p=,833	p=,470	p= ---	p=,478
sCD14 (µg.ml-1)	-,1571	,0798	-,0231	-,0358	-,1426	1,0000
	p=,425	p=,687	p=,907	p=,857	p=,478	p= ---

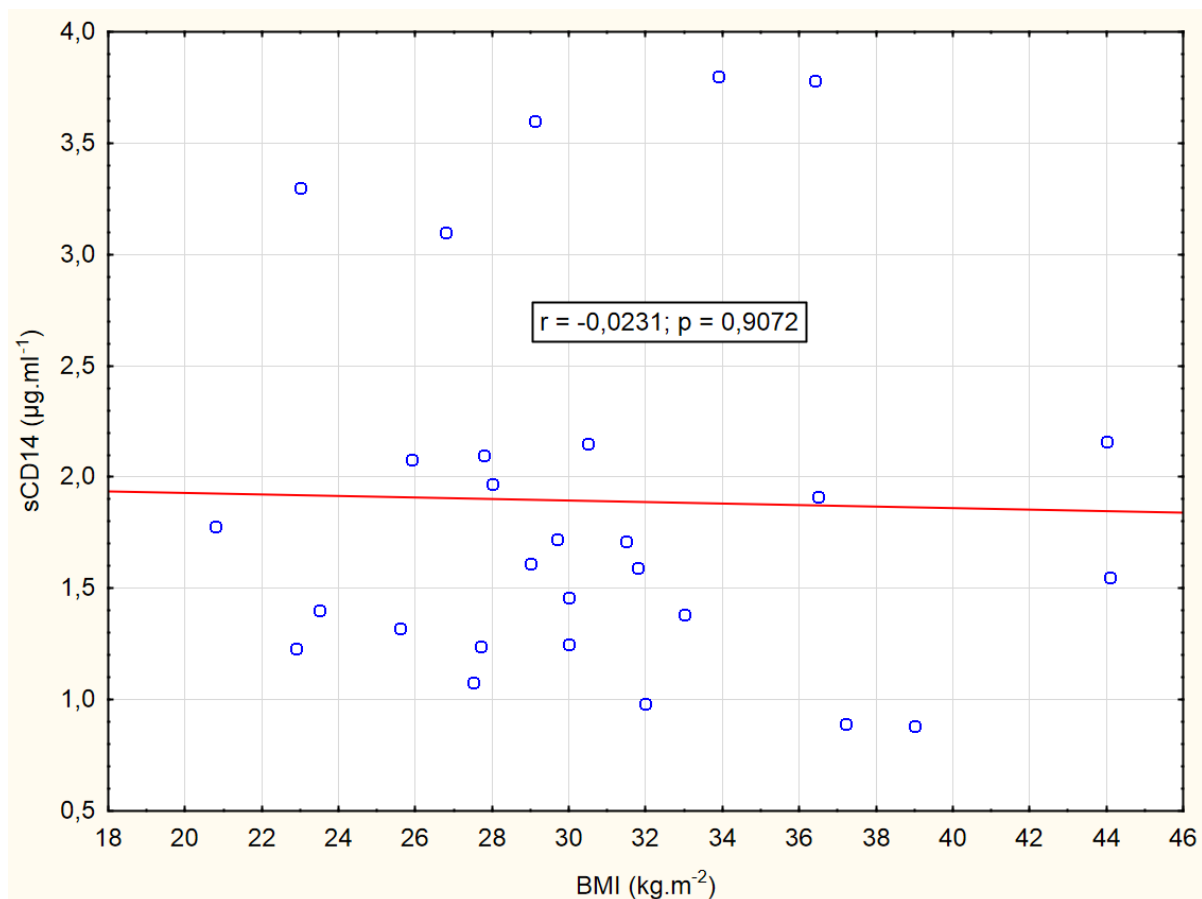












**4.4.4. Hypotéza 4:** Je poškození epitelové bariéry tenkého střeva u pacientů s celiakií příznivě ovlivnitelné bezlepkovou dietou?

Průměrné sérové hladiny všech tří testovaných markerů (cCK-18, I-FABP a sCD14) i četnosti jejich séropozitivity byly podstatně sniženy u pacientů s celiakií léčenou bezlepkovou dietou (CLD-GFD) ve srovnání s pacienty s recentně diagnostikovanou (neléčenou) celiakií (CLD) (obrázek 5, tabulka 3, tabulka 4). Avšak i přesto byly statisticky signifikantně zvýšené markery cCK-18 ( $p < 0,01$ ) a I-FABP ( $p < 0,01$ ) u pacientů CLD-GFD ve srovnání s kontrolní skupinou (C) (obrázek 5), ačkoliv tito pacienti přísně dodržovali bezlepkovou dietu.

## 4.5. Diskuze

**4.5.1. Hypotéza 1: A)** Je u diabetes mellitus 1. typu a 2. typu prokazatelné poškození epitelové bariéry tenkého střeva? **B)** Je toto poškození odlišné od charakteru poškození u celiakie?

**4.5.1. A)** Je u diabetes mellitus 1. typu a 2. typu prokazatelné poškození epitelové bariéry tenkého střeva?

V naší práci jsme našli, že u diabetes mellitus 1. typu i 2. typu je přítomno poškození epitelové bariéry tenkého střeva ve smyslu zvýšené apoptózy epitelových buněk (reprezentované zvýšením hladin cCK-18) a ve smyslu poškození enterocytů, resp. poškození integrity enterocytární vrstvy (reprezentované zvýšením hladin I-FABP). Zvýšení hladin obou těchto markerů dosahovalo statistické významnosti ve srovnání s kontrolní skupinou. Tato pozorování korespondují jak se znalostmi o morfologických i funkčních změnách sliznice tenkého střeva provázející oba typy diabetes mellitus, které byly popsány v teoretickém úvodu dizertační práce (Virally-Monod et al., 1998; Damci et al., 2003; Adachi et al., 2003; Rayner a Horowitz, 2006; Zhao et al., 2006; Shakil et al., 2008), včetně zvýšení paracelulární propustnosti tenkého střeva, jež je provázáno aktivací slizničního imunitního systému (Catalioto et al., 2011; Kort et al., 2011), tak korespondují se všeobecně přijímanou teorií o možném etiopatogenetickém spojení diabetes mellitus 1. typu a 2. typu s poruchou bariérové funkce tenkého střeva (Baggio a Drucker, 2002; Westerholm-Ormio et al., 2003; Vaarala, 2008).

Mezi oběma typy diabetes mellitus jsme však našli některé odlišnosti v sérologickém profilu testovaných markerů:

**1/** V obou skupinách pacientů s diabetes mellitus 1. typu (T1D a T1D/INS) byl zaznamenán určitý trend (byť statisticky nevýznamný ve srovnání s kontrolní skupinou) ke zvýšení markeru sCD14.

Zvýšené sérové hladiny sCD14 souvisejí s aktivací systému vrozené imunity a pravděpodobně i s translokací bakterií, resp. bakteriálního LPS, přes alterované mukózní povrchy (Litzman et al., 2012). Zvýšení markeru aktivace vrozeného imunitního systému je v souladu s etiopatogenetickým konceptem diabetes mellitus 1. typu jako autoimunitního onemocnění způsobeného destrukcí beta buněk pankreatu. Podle současných znalostí jsou v imunitně mediováných procesech, které poškozují beta buňky pankreatu, zapojeny složky vrozeného i adaptivního imunitního systému (Honkanen et al., 2010; Arif et al., 2011; Nokoff et al., 2012; Li et al., 2014). V posledním desetiletí narůstají zejména důkazy o zapojení patofyziologické kaskády aktivovaných toll-like receptorů (TLRs) systému vrozené imunity do rozvoje ostrůvkové autoimunity (Beyan et al., 2006; Zipris, 2008; Devaraj et al., 2008; Lien and Zipris, 2009; Meyers et al., 2010; Alkanani et al., 2012).

Vrozený imunitní systém a jeho TLRs mají roli především v rozpoznávání a eliminaci mikrobů. Součástí komplexu receptoru TLR4 (CD14/TLR4/MD2) je i molekula CD14, která rozpoznává zejména bakteriální lipopolysacharid. Aktivace TLRs vede přes řadu nitrobuněčných kaskád k aktivaci NF- $\kappa$ B a k uvolnění zánětlivých cytokinů a antibakteriálních peptidů. Patofyziologické kaskády následující po aktivaci TLRs mohou za určitých okolností vést k spuštění zánětlivé odpovědi, která aktivuje systém adaptivní imunity vedoucí k destrukci beta buněk pankreatu s následným rozvojem diabetes mellitus 1. typu (Lien a Zipris, 2009). Existují náznaky, že zvýšení sérové hladiny sCD14 koreluje i s rozsahem aktivace T-lymfocytů (Litzman et al., 2012).

Studie zabývající se sérologií a stavem imunitních buněk periferní krve pacientů s diabetes mellitus 1. typu prokazují odlišnosti v chování buněk vrozené imunity. Bylo například ukázáno, že u pacientů s diabetes mellitus 1. typu je na monocytech periferní krve zvýšena exprese receptorů TLR2 a TLR4 s jejich následnou signalizací, která vede k sekreci cytokinů (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , CXCL-10), což přispívá k navození zánětlivého stavu (Devaraj et al., 2008; Meyers et al., 2010; Alkanani et al., 2012).

Závěry z experimentů na zvířecích modelech diabetes mellitus 1. typu (NOD myši, BBDP potkani) podporují hypotézu, že systém vrozené imunity, aktivovaný prostřednictvím TLRs, je zapojen v aktivaci autoreaktivních T-lymfocytů a rozvoji ostrůvkové autoimunity (Zipris, 2008; Lien a Zipris, 2009). NOD myši s chybějící adaptorovou molekulou toll-like receptorů označovanou MyD88 (MyD88 knock-out) mají nízkou incidenci autoimunitního

diabetes mellitus i prokazatelné změny ve složení střevní mikrobioty. Při přenesení jejich mikrobioty bezmikrobním NOD myším (bez uvedeného knock-out) dochází i u nich (příjemců) ke snížení incidence autoimunitního diabetes mellitus (Wen et al., 2008). Interakce střevní mikrobioty se systémem přirozené imunity je patrně důležitým (epigenetickým?) faktorem v rozvoji diabetes mellitus 1. typu. Komponenty přirozené imunity mohou působit zjevně duálně, jako obránci první linie proti patogenním bakteriím a jako slizniční homeostatické prvky, ale také jako induktory rozvoje imunologicky-mediovaného poškození ostrůvků pankreatu (Lien a Zipris, 2009).

**2/** U pacientů s diabetes mellitus 2. typu (T2D) naše výsledky neprokázaly tendenci ke zvýšení markeru sCD14.

Rozložení sérových hladin sCD14, včetně jejich průměru a četnosti séropozitivity se u skupiny T2D nelišily od kontrolní skupiny (C). Tento výsledek byl spíše překvapivý, neboť u diabetes mellitus 2. typu existují některé nepřímé důkazy o aktivaci systému vrozené imunity a zvýšené expresi TLRs, včetně TLR4. V posledních desetiletích narůstá evidence, že inzulinovou rezistenci a diabetes mellitus 2. typu provází chronický subklinický („low-grade“) zánět v metabolicky aktivních tkáních zahrnujících tukovou tkáň, játra, kosterní svaly, pankreas, mozek a aktivace složek vrozené imunity v odpovědi na metabolický stres, nadměrný příjem nutrientů a energie (Gregor a Hotamisligil, 2011). Bylo ukázáno, že aktivace TLRs, zvláště TLR2 a TLR4, indukuje inzulinovou rezistenci, která má klíčovou roli v rozvoji diabetes mellitus 2. typu, metabolického syndromu, obezity i aterosklerózy (Dasu et al., 2010; Jialal et al., 2014a). TLR4 na makrofázích a adipocytech tukové tkáně jsou aktivovány nejen LPS, ale i volnými mastnými kyselinami (jejichž sérové hladiny jsou často zvýšené u obézních osob), což následně vede k aktivaci NF- $\kappa$ B a uvolnění zánětlivých mediátorů (jakými jsou např. IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) (Jialal et al., 2014a).

Studie na zvířecích modelech podpořily význam sCD14 jako markeru aktivace vrozené imunity provázející syndrom inzulinové rezistence a obezity. Např. myší model s chyběním receptoru CD14 (CD14 knock-out) vykazuje nízké množství tukové hmoty (Johnson et al., 2004; Roncon-Albuquerque et al., 2008), nevyvíjí inzulinovou rezistenci ani zánětlivou reakci tukové tkáně (Fernández-Real et al., 2011). Navíc podávání rekombinantního sCD14 vedlo ke snížení inzulinové rezistence u pokusných zvířat; tento efekt je vysvětlován vyvazováním

prozánětlivých ligandů (LPS a mastných kyselin) na sCD14, a tedy následným snížením aktivace CD14 na povrchu makrofágů a adipocytů a utlumením prozánětlivé signalizace v buňkách tukové tkáně (Fernández-Real et al., 2011).

Data týkající se zvýšení sérové hladiny sCD14 u pacientů s inzulínovou rezistencí a diabetes mellitus 2. typu však nejsou konzistentní. Fogelstrand et al. (2004) a Štulc et al. (2012) prokázali zvýšenou expresi CD14 u pacientů s diabetes mellitus 2. typu. Jialal et al. (2014b) našel u pacientů s počínajícím metabolickým syndromem (tedy u ještě neléčených pacientů) signifikantně zvýšenou sérovou hladinu sCD14, která korelovala se zvýšením exprese TLR4 i s indexem inzulínové rezistence (HOMA-IR). Naopak jiné studie (Leber et al., 2012; Gonzalez-Quintela et al., 2013) neprokázaly u pacientů s metabolickým syndromem signifikantní zvýšení sérové hladiny sCD14 ve srovnání se zdravými kontrolami. Jedním z možných vysvětlení tohoto jevu je fakt, že v uvedených studiích bylo významné procento pacientů léčeno hypolipidemiky, zejména statiny. Bylo popsáno, že statiny u pacientů s metabolickým syndromem vykazují výrazný protizánětlivý účinek (Devaraj et al., 2006; Štulc et al., 2012). Podobný protizánětlivý efekt a snížení exprese receptoru CD14 byl zaznamenán u pacientů s diabetes mellitus 2. typu léčených kromě statinů i fibráty (Štulc et al., 2012) a rosiglitazonem (Štulc et al., 2014).

V naší studii bylo 13 pacientů z 30 -ti členné skupiny T2D léčeno statinem, fibrátem, ev. kombinací obou léků. Proto se jsme se domnívali, že příčina nízkých sérových hladin sCD14 (statisticky srovnatelných s kontrolní skupinou) mohla spočívat v jejich poklesu navozeném hypolipidemickou léčbou. Při dodatečné statistické analýze (příloha 1) jsme srovnali sérové hladiny sCD14 u T2D pacientů neléčených a léčených hypolipidemiky. Podle očekávání se ukázalo, že sérové hladiny sCD14 jsou u T2D pacientů bez léčby vyšší než u T2D pacientů s hypolipidemickou léčbou, rozdíl však nebyl statisticky signifikantní ( $p = 0,438$ ).

Zvýšení hladiny sCD14 by u diabetes mellitus 1. a 2. typu pravděpodobně mohlo být způsobeno:

a/ zvýšenou produkcí a uvolňováním sCD14 krevními monocyty a neutrofilů v odpovědi na zvýšenou translokaci bakteriálního LPS z lumen střeva do systémové cirkulace při porušené intestinální bariéře nebo zvýšenou produkcí sCD14 LPS-independentní cestou v prozánětlivém prostředí, tj. stimulací krevních monocytů a neutrofilů prozánětlivými

cytokiny a následným uvolňováním sCD14 z intracelulárních skladovacích granulí těchto aktivovaných imunitních buněk (Litzman et al., 2012).

b/ alternativně může sCD14 vznikat při narušené intestinální bariéře v enterocytech (Funda et al., 2001) či v monocytech a makrofázích lamina propria mucosae tenkého střeva (ter Steege et al., 1997).

c/ v případě diabetes mellitus 2. typu lze uvažovat i o možnosti odštěpení sCD14 z mCD14 exprimovaných na adipocytech tukové tkáně (Nakarai et al., 2012).

**3/** Ve skupině pacientů s diabetes mellitus 2. typu (T2D) jsme prokázali nápadně vysoké hladiny markeru apoptózy epitelových buněk (cCK-18).

Interpretace tohoto nálezu spočívá nejpravděpodobněji v široké specifitě markeru cCK-18, který není pouze markerem apoptózy enterocytů, ale všech epitelových buněk, včetně jaterních buněk, buněk exokrinního pankreatu aj. epitelových tkání (Kramer et al., 2004; Luft et al., 2007). Poškození jakéhokoliv souboru epitelových buněk při déletrvajícím hyperglykémii navozené diabetes mellitus by tedy mohlo hladinu cCK-18 zvyšovat.

Sérová hladina cCK-18 je v současnosti mimo jiné zmiňována jako neinvazivní marker nealkoholické steatohepatitidy (NASH), která je charakterizována poškozením a časnou apoptózou hepatocytů (Bantel et al., 2001; Musso et al., 2011; Chen et al., 2014). NASH je jedním z podtypů nealkoholické jaterní steatózy, která velmi frekventně (v 40-75 %) provází diabetes mellitus 2. typu (Masarone et al., 2014).

Při analýze nálezů z abdominální ultrasonografie ve skupině T2D v naší studii, byl v 87 % (26/30) případů zjištěn různý stupeň jaterní steatózy. Dokonce všech devět pacientů séropozitivních pro cCK-18 mělo sonograficky detekovatelný vysoký stupeň steatózy. Současně přítomná NASH byla tedy v našem souboru pravděpodobnou příčinou zvýšení markeru cCK-18 u pacientů s diabetes mellitus 2. typu. Naše nálezy jsou v souladu s jinými studiemi (Machado a Cortez-Pinto, 2013; Dvořák et al., 2014; Morling et al., 2014). Autoři recentně publikované „The Edinburgh type 2 diabetes study“, jež zahrnuje 939 pacientů, považují elevaci markeru cCK-18 u pacientů s diabetes mellitus 2. typu za neinvazivní prediktivní marker rozvoje metabolických jaterních komplikací (Morling et al., 2014).

Nicméně zvýšení cCK-18 u pacientů s T2D a přítomnou jaterní steatózou není pouze odrazem přítomnosti zvýšené apoptózy hepatocytů, ale s nejvyšší pravděpodobností i



současně zvýšené apoptózy enterocytů, neboť právě i u NASH byla pozorována porucha bariérové funkce tenkého střeva (Arrieta et al., 2006).

V souvislosti s významem markeru cCK-18 v naší studii je nutno zdůraznit, že u kontrolní skupiny a u jiných patientských skupin než byla skupina T2D jsme ultrasonograficky detekovatelnou jaterní steatózu neprokázali. Současně jsme dokumentovali statisticky významný pokles sérové hladiny cCK-18 navozený bezlepkovou dietou u pacientů s celiakií, tj. v souvislosti se zlepšením bariérové funkce tenkého střeva. Proto se domníváme, že marker cCK-18 je u těchto testovaných skupin odrazem převážně poškození epitelové vrstvy tenkého střeva.

**4.5.1. B)** Je poškození epitelové bariéry tenkého střeva u diabetes mellitus odlišné od charakteru poškození u celiakie?

V naší studii jsme potvrdili, že mezi poškozením epitelové bariéry tenkého střeva u diabetes mellitus a u celiakie existují určité rozdíly.

Především se ukazuje, že poškození epitelové bariéry tenkého střeva (hodnocené sérovými hladinami všech tří markerů) u pacientů s diabetes mellitus obou typů je mírnější než u pacientů s recentní, tj. neléčenou celiakií.

Zásadním rozdílem však je, že jsme prokázali statisticky signifikantní zvýšení sCD14 pouze u pacientů s neléčenou celiakií, nikoliv u pacientů s oběma typy diabetes mellitus ani u pacientů s celiakií léčenou bezlepkovou dietou. Toto pozorování velice dobře koresponduje s konceptem celiakie jako autoimunitní choroby tenkého střeva s dokumentovaným patogenetickým zapojením systému vrozené i adaptivní imunity a s prokázanou poruchou bariérové funkce (Lundin a Sollid, 2014; Schuppan a Zimmer, 2013). Nález statisticky významně zvýšené hladiny sCD14 u pacientů s neléčenou celiakií nebyl dosud publikován a je dalším příspěvkem k narůstajícím důkazům o roli vrozeného imunitního systému v patofyziologii celiakie. Zvýšení hladiny sCD14 zde může být důsledkem aktivace vrozeného imunitního systému tenkého střeva jak samotným glutenem (Palová-Jelínková et al., 2005; Palová-Jelínková et al., 2013), tak i neglutenovými složkami obilného zrna (Junker et al., 2012), důsledkem aktivace vrozeného imunitního systému po translokaci LPS komensálních bakterií z lumen tenkého střeva do systémové cirkulace, dále může být sCD14 uvolňováno

enterocyty (Funda et al., 2001) či monocyto-makrofágovými buňkami lamina propria mucosae tenkého střeva (ter Steege et al., 1997). Ve sliznici tenkého střeva dětí s léčenou i neléčenou celiakií byly (na rozdíl od zdravých jedinců) detekovány gram-negativní bakterie (Forsberg et al., 2004) a na monocytárních buňkách lamina propria mucosa byla prokázána zvýšená exprese receptorů TLR2 a TLR4 rozpoznávající LPS gram-negativních bakterií (Szebeni et al., 2007). Zvýšení sCD14 může také souviset se zvýšenou apoptózou enterocytů provázející neléčenou celiakii, neboť receptor CD14 je schopen rozpoznávat rovněž součásti apoptotické buňky (Devitt et al., 1998; Kelley et al., 2013).

Shalimar et al. (2013) našli u 25 pacientů s neléčenou celiakií při imunohistochemickém vyšetření duodenální sliznice statisticky významně zvýšené hladiny apoptotických markerů a sníženou expresi apoptotických inhibitorů. Mezi markery společné apoptotické kaskády uvedení autoři hodnotili i hladinu markeru M30, který byl statisticky signifikantně zvýšen ( $p < 0,01$ ). Marker M30 je komerčním označením pro testování cCK-18. Naše pozorování týkající se cCK-18 u pacientů s neléčenou celiakií je s uvedeným nálezem v souladu a vykazuje statisticky významnější rozdíl ( $p < 0,001$ ) ve srovnání s kontrolní skupinou.

Tvrzení, že porucha bariérové funkce tenkého střeva je u pacientů s diabetes mellitus 1. a 2. typu mírnější než, je tomu u celiakie, by bylo zcela pochopitelné, kdybychom srovnávali klinický obraz diabetes mellitus s klinickým obrazem pouze typické, tj. symptomatické celiakie provázené gastrointestinálními příznaky (nejčastěji průjmy) s následným malabsorpčním syndromem. Toto tvrzení však platí i pro celiakii asymptomatickou (silentní). V současnosti je známým faktem změněný fenotyp celiakálních projevů, kdy většina pacientů v době diagnózy celiakie nemá přítomnu výraznou gastrointestinální symptomatologii či malabsorpční syndrom, tedy nemá klinicky zjevné známky postižení tenkého střeva (Tack et al., 2010; Guandalini a Assiri, 2014). Taktéž v naší studii většina pacientů (40 ze 43) s recentně diagnostikovanou celiakií byla asymptomatických a diagnóza celiakie u nich byla stanovena na základě skríninkového vyšetření. Nejčastěji šlo o skrínink prvostupňových příbuzných pacientů s již známou celiakií či o vyšetření v rámci diferenciální diagnostiky sideropenické anemie či osteoporózy.

Rozdíly v různých aspektech poruchy bariérové funkce střeva jsou patrné nejen při srovnání celiakie s diabetes mellitus 2. typu, tedy nemocí s odlišnou patogenezí, ale i při

srovnání obou autoimunitních chorob, tj. diabetes mellitus 1. typu a celiakie. Pro intestinální zánět u symptomatické i siletní formy celiakie je typická porucha slizniční architektury charakterizovaná zvýšeným počtem intraepiteliálních lymfocytů, hyperplazií krypt a vilózní atrofií (Marsh, 1992). Takovéto morfologické změny nejsou u diabetes mellitus 1. typu (ani 2. typu) prokazatelné. Avšak kromě symptomatické a siletní celiakie je další uznávanou formou celiakie potenciální, která je charakterizována séropozitivitou specifických celiakálních autoprotilátok při normálním histologickém nálezu na sliznici tenkého střeva (Sapone *et al.*, 2012). Nicméně při imunohistochemickém vyšetření jsou v případě potenciální celiakie prokazatelné imunologické odlišnosti od diabetes mellitus 1. typu: zvýšená denzita intraepiteliálních lymfocytů nesoucích  $\gamma\delta$ -T buněčný receptor (TCR) (Arranz *et al.*, 1994).

Narůstají důkazy, že u diabetes mellitus 1. typu je subklinický intestinální zánět součástí patofyziologie této nemoci (Vaarala, 2008; Vaarala *et al.*, 2008), s charakteristickým zvýšením cytokinové exprese a aktivace intestinálních lymfocytů ve sliznici tenkého střeva, které je však odlišné od zánětlivého intestinálního prostředí u celiakie; ačkoliv obě choroby jsou imunitně mediované (autoimunitní) a sdílejí predisponující genetické pozadí: geny HLA-DQ2 a HLA-DQ8. Například Westerholm-Ormio *et al.* (2003) našli v jinak histologicky normálním tenkém střevě pacientů s diabetes mellitus 1. typu (a nikoliv u pacientů s celiakií) zvýšenou expresi intracelulární adhezní molekuly ICAM-1 a zvýšenou denzitu IL-1 $\alpha$  a IL-4 pozitivních buněk v lamina propria mucosae. Naproti tomu, při koincidenci diabetes mellitus 1. typu a celiakie prokázali zvýšenou denzitu IL-2, IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  pozitivních buněk (Westerholm-Ormio *et al.*, 2003). Kromě toho se enterobiopsické nálezy u diabetes mellitus 1. typu liší od aktivní celiakie i nízkou přítomností regulačních Foxp3<sup>+</sup> T-lymfocytů (Tiittanen *et al.*, 2008; Badami *et al.*, 2011; Lahdenperä *et al.*, 2012). Naopak ve sliznici tenkého střeva u recentní celiakie bylo ve srovnání s diabetes mellitus 1. typu pozorováno signifikantní zvýšení Th-1 imunity provázené zvýšením exprese IFN- $\gamma$  (Lahdenperä *et al.*, 2011) a Th-17 imunity, resp. zvýšená exprese IL-17 (Lahdenperä *et al.*, 2012).

**4.5.2. Hypotéza 2:** Koreluje poškození epitelové bariéry tenkého střeva u diabetes mellitus 1. typu s:

A) délkou trvání diabetes mellitus?

B) parametrem kompenzace diabetes mellitus, tj. hladinou glykosylovaného hemoglobinu?

V případě diabetes mellitus 1. typu s probíhající inzulinitidou (T1D/INS) jsme neprokázali statisticky významnou korelaci mezi žádným z testovaných markerů (cCK-18, I-FABP, sCD14) a dobou trvání diabetes mellitus či s hladinou HbA1c.

V případě diabetes mellitus 1. typu s vyhaslou inzulinitidou (T1D) jsme prokázali statisticky významnou pozitivní korelaci, avšak na nízké hladině významnosti, pouze mezi markerem cCK-18 a HbA1c ( $r = 0,5047$ ,  $p = 0,028$ ).

Ve skupině diabetes mellitus 1. typu jsme nenalezli významné rozdíly v průměrech hladin všech tří hodnocených markerů (cCK-18, I-FABP a sCD14) mezi podskupinou s probíhající inzulinitidou (T1D/INS) a podskupinou s vyhaslou inzulinitidou (T1D).

Studie zabývající se vztahem diabetes mellitus 1. typu ať s probíhající či s již vyhaslou inzulinitidou ve vztahu k různým aspektům poškození intestinální bariéry jsou doposud spíše ojedinělé a jejich výsledky jsou kontroverzní.

U jedinců s rizikem rozvoje diabetes mellitus 1. typu (tj. u prvostupňových příbuzných pacientů s diabetes mellitus 1. typu) byla nalezena TLRs indukovaná cytokinová dysregulace (zvýšení hladin IL-1 $\beta$  a snížení IL-6) pouze u osob s přítomností autoprotilátek namířených proti ostrůvkovým strukturám, tj. pouze u prediabetických jedinců, a nikoliv u jedinců séronegativních. Nebyla však nalezena korelace hladin těchto cytokinů s hladinou HbA1c. Tato skutečnost může poukazovat na zapojení TLRs a systému vrozené imunity do časných (prediabetických) stadií inzulinitídy spíše než na zapojení TLRs do progresu diabetes mellitus (Alkanani et al., 2012). Pokud přijmeme tuto hypotézu, pak by i naše pozorování mohla naznačovat, že probíhající inzulinitída neovlivňuje poruchu epitelové bariéry tenkého střeva u již manifestovaného diabetes mellitus 1. typu. Toto vysvětlení by pak bylo v souladu s nálezy ve zvířecích modelech tohoto onemocnění, kdy zvýšená střevní propustnost provází prediabetická stadia inzulinitídy (Visser et al., 2010; Lee et al., 2010) a je v prediabetických stadiích dokonce vyšší než při manifestovaném diabetes mellitus (Meddings et al., 1999; Neu

et al., 2005). Porucha bariérové funkce u manifestovaného diabetes mellitus by pak byla spíše důsledkem hyperglykémie než důsledkem probíhající či proběhlé inzulinitídy.

Existují pozorování podporující hypotézu, že dlouhotrvající hyperglykémie může vést ke zvýšené permeabilitě intestinální bariéry. Damci et al. (2003) ukázali, že u pacientů s diabetes mellitus 1. typu je zvýšená intestinální permeabilita (měřená metodou  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ ) ve vztahu ke zvýšené hladině glykémie. Podobně v myším modelu diabetes mellitus bylo recentně ukázáno, že hyperglykémie navozuje zvýšení intestinální permeability a poškození struktur tight junctions (Qing et al., 2015).

Dalo by se tedy očekávat, že vlivem hyperglykémie při déletrvajícím diabetes mellitus (tj. při vyšší sérové hladině HbA1c) bude docházet vlivem zvýšené intestinální permeability i ke zvýšené translokaci bakteriálního LPS z lumen střeva do systémového oběhu a s tím spojenému zvýšení sCD14, jako markeru aktivace vrozeného imunitního systému. Co se však týče hodnocení aktivace systému vrozené imunity, byla publikována rovněž kontroverzní pozorování. Meyers et al. (2010) nenalezli u pacientů s nově diagnostikovaným diabetes mellitus 1. typu korelaci mezi aktivací TLR4 na povrchu monocytů periferní krve a hladinou HbA1c.

Bylo však také ukázáno, že imunitní procesy spojené s iniciálními stadii diabetes mellitus 1. typu se liší od těch, jež jsou pozorovány po několika měsíční či několikaleté progresi onemocnění (Wang et al., 2008). Studie zkoumající pacienty s již rozvinutými stadii diabetes mellitus 1. typu prokazují korelaci mezi expresí TLR2 a TLR4 receptorů na monocytech periferní krve a hladinou HbA1c (Devaraj et al., 2008). Navíc Dasu et al. (2008) prokázali, že hyperglykémie (nad 15 mmol/l) indukuje expresi TLR4 a TLR2 receptorů na monocytech periferní krve.

Je tedy možné, že aktivace TLRs je zapojena jak do velmi časných stadií inzulinitídy, tak i do progresu komplikací diabetes mellitus vlivem déletrvajících hyperglykémie.

Jiní autoři naopak popsali, že zvýšená střevní permeabilita je u diabetických pacientů přítomna, však nekoreluje s délkou trvání diabetes mellitus a ani s hladinou HbA1c (Kuitunen et al., 2002; Secondulfo et al., 2004; Sapone et al., 2006).

**4.5.3. Hypotéza 3:** Koreluje poškození epitelové bariéry tenkého střeva u diabetes mellitus 2. typu s:

A) délkou trvání diabetes mellitus?

B) parametrem kompenzace diabetes mellitus, tj. hladinou glykosylovaného hemoglobinu?

C) body mass indexem?

V případě diabetes mellitus 2. typu (T2D) jsme prokázali statisticky významnou negativní korelaci pouze mezi markerem apoptózy epitelových buněk cCK-18 a dobou trvání diabetes mellitus ( $r = -0,4267$ ,  $p = 0,021$ ).

Toto pozorování bylo překvapivé, neboť považujeme-li u našich pacientů s T2D sérovou hladinu cCK-18 za marker přítomnosti NASH (Chen et al., 2014), jak bylo popsáno výše, pak bychom spíše očekávali, že s dobou trvání diabetes mellitus 2. typu se bude prevalence této metabolické jaterní komplikace zvyšovat. Příčinou tohoto jevu by mohl být vliv hypolipidemické léčby, která pravděpodobně také ovlivnila sérovou hladinu sCD14 mechanismem snížení systémového „low-grade“ zánětu. Nadto je známo, že i léčba perorálními antidiabetiky snižujícími inzulínovou rezistenci vede k určité regresi jaterní steatózy (Olaywi et al., 2013; Fukuhara et al., 2014). Vzhledem k tomu, že 26 pacientů skupiny T2D (z celkového počtu 30) bylo léčeno perorálními antidiabetiky, pak snížení markeru cCK-18 při postupující době trvání diabetes mellitus by mohlo být vysvětlitelné určitou mírou regrese NASH vlivem této antidiabetické léčby.

Obtížně interpretovatelné jsou výsledky týkající se vztahu sérové hladiny sCD14 k době trvání diabetes mellitus 2. typu či k hladině HbA1c či k BMI. Většina metabolických parametrů (množství tukové hmoty, hladina cholesterolu a triacylglycerolů, HbA1c, glykémie a index inzulínové rezistence HOMA-IR) je významně ovlivněna hodnotou BMI a *vice versa* hodnota BMI do velké míry koreluje s přítomností metabolických poruch (Ohwaki a Yano, 2009). Nicméně naše výsledky u markeru sCD14 ve skupině pacientů s diabetes mellitus 2. typu byly zřejmě do velké míry ovlivněny hypolipidemickou léčbou, jak bylo popsáno výše.

Fogelstrand et al. (2004) popsali zvýšenou expresi CD14 na monocytech periferní krve (spolu se zvýšenou sérovou hladinou C-reaktivního proteinu a IL-6) u pacientů s diabetes mellitus 2. typu. Hladina CD14 pozitivně korelovala s BMI a v menší míře i s glykemickou kontrolou. Rovněž Dasu et al. (2010) prokázali, že u pacientů s diabetes mellitus 2. typu

exprese TLR4 na monocytech periferní krve pozitivně koreluje s BMI, s indexem inzulínové rezistence (HOMA-IR), s hladinou HbA1c a s hladinou volných mastných kyselin.

Ukazuje se, že TLRs hrají roli nejen v inzulínové rezistenci, ale i ve vývoji aterosklerózy a obezity (Fogelstrand et al., 2004; Dasu et al., 2010; Vila et al., 2014). TLR4 na povrchu makrofágů periferní krve a adipocytů rozpoznávají kromě LPS i volné mastné kyseliny, což vede produkci prozánětlivých cytokinů a akceleraci aterosklerózy (Shi et al., 2006).

Verdam et al. (2011) popisují nejen zvýšení sérové hladiny I-FABP u obézních osob s chronickou hyperglykemií (na rozdíl od obézních bez chronické hyperglykémie), ale i nález pozitivní korelace mezi hladinou I-FABP a hladinou HbA1c; a dále i zvýšení sérové hladiny citrulinu (marker funkční masy enterocytů) a zvýšeného poměru sérových hladin I-FABP/citrulin. Zvýšený poměr I-FABP/citrulin naznačuje, že poškození a zánik enterocytů převládá nad proliferací a funkční masou enterocytů u jedinců s chronickou hyperglykemií. Chronická hyperglykémie tak může přispívat k poruše bariérové funkce tenkého střeva u diabetes mellitus 2. typu.

Valentini *et al.* (2014) ukázali, že poškození intestinální bariéry není závislé na věku a stárnutí. Zvýšená střevní propustnost (měřená testem laktulóza/manitol) byla v této studii signifikantně zvýšená při současné přítomnosti „low-grade“ zánětu u diabetes mellitus 2. typu a nebyla závislá na věku nemocných.

Vztah markerů cCK-18, I-FABP a sCD14 k poruše bariérové funkce tenkého střeva u diabetes mellitus 2. typu je obtížně interpretovatelný a do velké míry ovlivnitelný konkomitantní medikací u těchto pacientů. Zejména hypolipidemická léčba a léčba zaměřená na potlačení inzulínové rezistence interferuje s výsledky a pravděpodobně vysvětluje rozdílné nálezy v řadě studií.

**4.5.4. Hypotéza 4:** Je poškození epitelové bariéry tenkého střeva u pacientů s celiakií příznivě ovlivnitelné bezlepkovou dietou?

Naše výsledky ukázaly, že průměrné sérové hladiny všech tří testovaných markerů (cCK-18, I-FABP a CD14) i četnosti jejich séropozitivity byly významně sníženy u pacientů léčených bezlepkovou dietou (CLD-GFD) ve srovnání s pacienty s recentně diagnostikovanou

(neléčenou) celiakií (CLD). Toto pozorování potvrdilo všeobecně známý a očekávaný příznivý efekt bezlepkové diety na reparaci sliznice tenkého střeva u pacientů s celiakií. Nicméně při srovnání s kontrolní skupinou (C) byly průměrné sérové hladiny těchto markerů mírně zvýšené ve skupině CLD-GFD i přesto, že tito pacienti přísně dodržovali bezlepkovou dietu.

Domníváme se ve shodě s jinými autory, že tento nález dokumentuje persistující mírnou poruchu intestinální bariéry u dospělých pacientů s celiakií navzdory přísnému dodržování bezlepkové diety (Adriaanse et al., 2013). Dietní adherence u našich pacientů skupiny CLD-GFD byla dokumentována normálními hladinami celiakálních autoprotilátek (EMA, anti-t-TG IgA). Uvedené tvrzení o ne zcela dokonalé reparaci sliznice tenkého střeva i přes přísné dodržování bezlepkové diety podporují i nálezy z morfologických studií. V enterobiopsických vzorcích pacientů dodržujících bezlepkovou dietu jsou prokazatelné mírné morfometrické abnormality sliznice tenkého střeva týkající se plochy klků a hloubky krypt (Cummins et al., 2011) a elektronmikroskopicky je patrné poškození enterocytů (Sbarbati et al., 2003) při jinak normálním histologickém nálezu hodnoceném Marshovou klasifikací, tj. při stadiu Marsh 0.

Z těchto nálezů vyplývá, že mírné poškození enterocytů je nezávislé na produkci celiakálních autoprotilátek, či přinejmenším na jejich uvolňování ze sliznice tenkého střeva do systémového oběhu, neboť při přísném dodržování bezlepkové diety dochází k normalizaci jejich sérových hladin, zatímco depozita těchto autoprotilátek jsou ve sliznici tenkého střeva prokazatelná i více než dva roky (Koskinen et al., 2010). Příčina přetrvávajícího mírného poškození enterocytů u dospělých jedinců s celiakií i přes dodržování bezlepkové diety je nejasná; zvažuje se imunogenní vliv nepatrných stop glutenu ve stravě či vliv persistující imunologické dysregulace a aktivace intraepiteliálních lymfocytů, které nejsou na glutenu závislé (Lahdenperä et al., 2011; Adriaanse et al., 2013).

Dosud nejvíce studovaným neinvazivním markerem poškození enterocytů u celiakie je I-FABP. Pilotní studie prokazující zvýšené hladiny I-FABP (ve srovnání se zdravými kontrolami) byla provedena na malé skupině dětí a dospělých s celiakií s histologicky dokumentovanou vilózní atrofií (Derikx et al., 2009). Nedávná studie prokázala statisticky významné zvýšení ( $p < 0,001$ ) hladin I-FABP u dětí s neléčenou celiakií a za 12 týdnů po zavedení bezlepkové diety významný pokles hladin I-FABP a dokonce jejich normalizaci v 80



% případů. Sérové koncentrace I-FABP u neléčené celiakie zároveň korelovaly s tíží vilózní atrofie v tenkém střevě (Vreugdenhil et al., 2011).

Naše výsledky týkající se sérových hladin I-FABP u dospělých s celiakií jsou ve shodě s výše uvedenými pozorováními i s recentní studií (Adriaanse et al., 2013), která dokumentovala signifikantně zvýšené sérové hladiny I-FABP u dospělých pacientů s neléčenou celiakií a snížení těchto hladin během prvního roku po zavedení bezlepkové diety. Avšak ani v období 3 let neklesly hladiny I-FABP na úroveň kontrolní skupiny (ačkoliv hladiny specifických autoprotilátek i histologický nález v tenkém střevě se vlivem bezlepkové diety normalizovaly). Současně se ukázalo, že zvýšené hladiny I-FABP u neléčené celiakie korelují jak s hladinami anti-t-TG IgA ( $r = 0,403$ ;  $p < 0.01$ ), tak s tíží histologického nálezu v duodenu hodnoceného podle Marshovy klasifikace ( $r = 0,265$ ;  $p < 0.05$ ) (Adriaanse et al., 2013).

Při dodatečné statistické analýze (příloha 2) jsme hodnotili vztah všech tří testovaných markerů (cCK-18, I-FABP a sCD14) k hladině anti-t-TG IgA u našich pacientů s recentně diagnostikovanou celiakií (CLD). Sérové hladiny I-FABP u neléčené celiakie (CLD) vykazovali trend k pozitivní korelaci s hladinami anti-t-TG IgA ( $r=0,5839$ ;  $p = 0,098$ ).

Statisticky významnou pozitivní korelaci jsme u CLD pacientů prokázali mezi sérovými hladinami cCK-18 a hladinami anti-t-TG IgA ( $r = 0,7415$ ;  $p = 0,0222$ ). Bullen užíval k identifikaci apoptózy lidských enterocytů *in situ* metodiku založenou na imunohistochemickém průkazu protilátek M30 proti kaspázou štěpenému cytokeratinu 18 (Bullen et al., 2006). I vzhledem k tomu lze považovat testování sérové hladiny cCK-18 u pacientů s celiakií v naší studii za marker apoptózy enterocytů.

Mezi sérovým markerem sCD14 a hladinou anti-t-TG IgA jsme u CLD pacientů neprokázali korelaci. Nicméně u pacientů skupiny CLD-GFD byla nepochybně vlivem bezlepkové diety průměrná hladina tohoto markeru výrazně snižena ve srovnání s CLD skupinou, podobně jako tomu bylo i u markerů cCK-18 a I-FABP. Sérová hladina sCD14 nebyla dosud u pacientů s celiakií studována. Uvedený nález je však souladu s narůstajícími důkazy o zapojení systému přirozené imunity v etiopatogenezi celiakie.

## 4.6. Souvislosti s klinickou praxí

### 4.6.1. Dietní opatření u chorob provázených poruchou bariérové funkce tenkého střeva.

Molekulárním spojením mezi poruchou bariérové funkce tenkého střeva a aktivací vrozeného imunitního systému u diabetes mellitus 1. typu i 2. typu může být bakteriální LPS, k jehož zvýšené translokaci z lumen tenkého střeva do systémové cirkulace u těchto chorob dochází (Cani et al., 2008a; Shen et al., 2013; Caricilli a Saad, 2013). Bakteriální LPS v nízkých sérových koncentracích vyvolává expresi TLR2 a TLR4 (včetně receptoru CD14) na buňkách monocyto-makrofágové řady i na adipocytech s následnou aktivací zánětlivých kaskád (Caricilli a Saad, 2013). Systémový „low-grade“ zánět přispívá k inzulínové rezistenci, jejíž patogenetické spojení s diabetes mellitus 2. typu je všeobecně známé. Narůstají však i důkazy o inzulínové rezistenci provázející diabetes mellitus 1. typu, byť má odlišné fenotypické projevy (chybění rysů metabolického syndromu, chybění korelace množství intraabdominálního tuku s indexem inzulínové rezistence) od inzulínové rezistence provázející diabetes mellitus 2. typu. Inzulínová rezistence, stejně jako „low-grade“ systémový zánět, jsou považovány za jednu z příčin endoteliální dysfunkce a akcelerace mikro- a makro-vaskulárních komplikací diabetes mellitus obou typů (Nokoff et al., 2012; Bjornstad et al., 2015). Podle současných znalostí hraje zánětlivý proces centrální roli i v samotné ateroskleróze (Libby et al., 2002). „Low-grade“ systémový zánět se podílí na akceleraci aterosklerózy nejen u diabetes mellitus obou typů (Maahs et al., 2014; Xu, 2015), ale i u celiakie (Rybak et al., 2014).

Jednou z přirozených možností jak zmírnit systémový „low-grade“ zánět se všemi jeho neblahými metabolickými důsledky u chorob spojených s poruchou intestinální bariéry by mohla být dietní opatření založená na příjmu nutrientů, které výhodně ovlivňují složení střevní mikrobioty a tím vyvolávají minimální aktivaci imunitního systému (Bjornstad et al., 2015). Takováto dieta je označována jako anti-inflamatorní (Giugliano et al., 2006) a spočívá v příjmu dostatku omega-3 mastných kyselin, přirozených antioxidantů a vlákniny, tj. v příjmu ryb, ovoce, zeleniny, ořechů a celozrnných produktů.

Naproti tomu tzv. západní dieta, tj. vysokosacharidová a vysokotuková dieta bohatá na rafinované škroby a cukry, na saturevané mastné a trans-mastné kyseliny, je spojena se významným nárůstem obezity i systémového „low-grade“ zánětu. U obézních osob bylo

dokumentováno (ve srovnání se štíhlými) odlišné složení střevní mikrobioty (tj. dysbióza) spočívající zejména ve zvýšeném zastoupení kmenů *Firmicutes* a sníženém zastoupení kmenů *Bacteroidetes*, jež vede ke zvýšení energetického využití potravy ale i ke zvýšení „low-grade“ zánětu (Caricilli a Saad, 2013). Na zvířecích modelech bylo ukázáno, že příznivé dietní změny mají signifikantní vliv na složení střevní mikrobioty (Caricilli a Saad, 2013). Několik klinických intervenčních studií dokumentovalo rovněž pozitivní vliv anti-inflamatorní diety na sérové hladiny solubilních markerů systémového zánětu, markerů endoteliální dysfunkce i na markery zánětlivé buněčné aktivity (Nettleton et al., 2010).

Vrozený imunitní systém cestou aktivace TLR4 představuje spojení mezi dietou, intestinální mikrobiotou, regulací energetického metabolismu, prozánětlivým prostředím, inzulínovou rezistencí a aterosklerózou (Shi et al., 2006; Jialal et al., 2014a). Anti-inflamatorní dieta tak může vhodným způsobem zasáhnout do bludného patofyziologického kruhu u chorob spojených s poruchou bariérové funkce střeva, ať už je porušená intestinální bariéra příčinou či jen epifenomémem uvedených jevů.

#### **4.6.2. Solubilní CD14 jako marker „low-grade“ zánětu.**

Multivariátní analýza srovnávající řadu zánětlivých markerů ukázala, že zejména exprese membránového receptoru CD14 a TLR2 na monocytech periferní krve a exprese destičkového glykoproteinu IIb je statisticky významně snížena ( $p = 0,01$ ;  $0,04$  a  $0,01$ ) při anti-inflamatorní dietě (Nettleton et al., 2010). Vzhledem k náročnosti hodnocení exprese těchto buněčných receptorů metodou průtokové cytometrie se domníváme, že vhodnějším markerem „low-grade“ systémového zánětu (a tedy rizika rozvoje inzulínové rezistence a endoteliální dysfunkce) by mohla být sérová hladina sCD14. Sérová hladina s CD14 má úzký vztah k výše uvedenému membránovému receptoru CD14, který je součástí receptorového komplexu CD14/TLR4/MD2, jak bylo popsáno v kapitole 4.1 této dizertační práce. Podstatnou výhodou spojenou s tímto markerem je (ve srovnání s průtokovou cytometrií) jeho jednodušší metodika stanovení založená na ELISA testování. Jialal et al. (2014b) popsali u pacientů s metabolickým syndromem signifikantní zvýšení sCD14, které odráželo zvýšenou expresi TLR4 a pozitivně korelovalo s indexem inzulínové rezistence (HOMA-IR). Mo et al. (2010) našli pozitivní korelaci mezi zvýšenými sérovými hladinami sCD14, CRP a markeru

endoteliální dysfunkce E-selectinu u pacientů s nově diagnostikovaným diabetes mellitus 2. typu.

Vzhledem k zapojení receptorového komplexu CD14/TLR4/MD2 i do procesu aterosklerózy (Bjornstad et al., 2015) se domníváme, že sCD14 by mohl sloužit nejen jako marker „low-grade zánětu“, ale i jako marker rizika progresu aterosklerózy u diabetes mellitus obou typů, eventuelně u dalších chorob spojených s poruchou bariérové funkce tenkého střeva. Bylo ukázáno, že zvýšená sérová hladina sCD14 provází subklinickou přítomnost LPS gramnegativních bakterií v systémovém oběhu (Nakarai et al., 2012). Naše práce rovněž naznačila význam sCD14 při hodnocení poruchy bariérové funkce tenkého střeva tím, že ukázala jeho statisticky signifikantní zvýšení u pacientů s neléčenou celiakií, tedy podpořila souvislost vztahu sCD14 a možné translokace bakteriálního LPS přes alterovanou intestinální bariéru do systémového oběhu.

#### **4.6.3. cCK-18 jako neinvazivní marker nealkoholické steatohepatitidy u diabetes mellitus 2. typu**

V naší práci pozorované zvýšení sérových hladin cCK-18 zejména u pacientů s diabetes mellitus 2. typu a sonograficky detekovanou jaterní steatózou naznačují, že cCK-18 není markerem, který by byl vhodný pro posouzení apoptózy enterocytů, resp. pro posouzení stavu epitelové intestinální bariéry.

V současnosti je sérová hladina cCK-18 považována za marker proliferace epitelových karcinomů (Hamilton, 2012) a za neinvazivní marker nealkoholické steatohepatitidy (NASH) (Chen et al., 2014). Nealkoholická jaterní steatóza a její podtyp NASH jsou velmi často jaterní komplikací metabolického syndromu a diabetes mellitus 2. typu. Zatímco prostá jaterní steatóza nemá žádné klinické konsekvence, NASH je charakterizována nekro-inflamatorním procesem, progresí do jaterní fibrózy, cirhózy a rizikem vzniku hepatocelulárního karcinomu (Olaywi et al., 2013). Zobrazovací vyšetřovací metody (jaterní ultrasonografie, počítačová tomografie či magnetická rezonance) nejsou dostatečně senzitivní v rozlišení prosté jaterní steatózy a NASH (Hernaes et al., 2011). I jaterní biopsie má řadu limitací (Sumida et al., 2014). V klinické praxi by identifikace pacientů s NASH dostupným neinvazivním markerem,

jakým je sérová hladina cCK-18, mohla vést jak k intenzivní terapii tohoto onemocnění (Olaywi et al., 2013; Fukuhara et al., 2014), tak k indikaci pravidelných kontrol jaterního parenchymu zobrazovacími metodami k včasnému zachytu a léčbě jeho komplikací, včetně těch maligních.

#### **4.6.4. I-FABP jako marker reziduálního poškození enterocytů u celiakie léčené bezlepkovou dietou**

Jak bylo uvedeno v diskuzi této dizertační práce, i naše studie ukázala ve skupině pacientů léčených bezlepkovou dietou přetrvávající zvýšení sérových hladin I-FABP a cCK-18 i přes dokumentované dodržování bezlepkové diety. Zejména I-FABP je senzitivním markerem enterocytárního poškození na rozdíl od cCK-18, který odráží apoptózu všech epitelových buněk.

V souladu s jinými autory (Vreugdenhil et al., 2011; Adriaanse et al., 2013) se domníváme, že I-FABP by mohl být objektivním markerem k posouzení reziduálního enterocytárního poškození u pacientů s normalizovanými hladinami specifických celiakálních autoprotilátek. I-FABP umožňuje citlivější kontrolu dodržování bezlepkové diety a monitorování jejího efektu, než poskytuje dosud v klinické praxi rozšířená kontrola pomocí sérových hladin specifických celiakálních autoprotilátek, které přísně vzato odrážejí jen úroveň autoimunitní odpovědi na konzumaci gliadinu. Reziduální slizniční poškození je provázeno určitými nutričními deficity a současně může přispívat k autoimunitním a maligním komplikacím celiakie (Rubio-Tapia et al., 2010; Lanzini et al., 2009). Posouzení reziduálního slizničního poškození je tedy v klinickém sledování pacienta s celiakií velmi důležité.

Rovněž u tzv. séronegativní celiakie, charakterizované typickým enterobiopsickým nálezem při negativitě specifických celiakálních autoprotilátek (Ierardi et al., 2015) by vyšetření sérové hladiny I-FABP mohlo přispívat k identifikaci pacientů indikovaných k intestinální biopsii, neboť zvýšená hladina I-FABP predikuje vilózní atrofii sliznice tenkého střeva (Vreugdenhil et al., 2011). Dále v případě nálezu zvýšených celiakálních autoprotilátek v séru u pacientů s hraničním histologickým nálezem (Marsh stadium 0-1) by zvýšení sérové

hladiny I-FABP podpořilo diagnózu celiakie a vhodnost léčby bezlepkovou dietou (Kurppa et al., 2010).

Ze zavedení vyšetřování sérové hladiny I-FABP do klinické praxe by mohli profitovat kromě pacientů s celiakií i nemocní s jinými obtížně diagnostikovatelnými onemocněními tenkého střeva, jakými jsou mezenteriální ischemie či trombóza, nekrotizující enterokolitída či pacienti s časnou fází sepse, kde by však sérové hladiny I-FABP byly řádově vyšší (Derikx et al., 2010).

## 5. ZÁVĚR

Naše práce potvrdila přítomnost poruchy bariérové funkce tenkého střeva na úrovni intestinálního epitelu u pacientů s diabetes mellitus 1. typu a 2. typu a současně ukázala, že tato porucha je mírnějšího stupně, než je tomu u modelového onemocnění tenkého střeva, jakým je celiakie. Vzájemný vztah mezi poruchou intestinální bariéry a délkou trvání či kompenzací diabetes mellitus (tedy déletrvající hyperglykemií) naše výsledky neukázaly. Byť je soubor našich pacientů relativně malý, mohla by nepřítomnost uvedeného vztahu podporovat spíše teorii o kauzální spojitosti poruchy bariérové funkce tenkého střeva s rozvojem obou typů diabetes mellitus a svědčit proti očekávání, že porušená střevní bariéra je jen důsledkem déletrvající hyperglykémie.

U pacientů s recentně diagnostikovanou a tedy dosud neléčenou celiakií naše výsledky podle očekávání potvrdily výraznou poruchu integrity epitelové bariéry tenkého střeva. Kromě toho jsme popsali statisticky signifikantní zvýšení markeru aktivace systému vrozené imunity, sérové hladiny sCD14 u pacientů s neléčenou celiakií; pokud je nám známo, tento nález nebyl dosud publikován. Avšak i u pacientů přísně dodržujících bezlepkovou dietou se ukázalo, že reziduální porucha intestinální bariéry stále přetrvává.

Naše výsledky a rozbor dostupné literatury uvedený v diskuzi naznačují potenciál klinického využití námi studovaných neinvazivních markerů poškození epitelové bariéry tenkého střeva. Zejména I-FABP se jeví jako vhodný specifický marker poškození enterocytů. Sérová hladina cCK-18 se zdá být markerem poškození enterocytů, ale i markerem přítomnosti non-alkoholické steatohepatitidy u pacientů s (nejen) diabetes mellitus 2. typu. Sérová hladina sCD14 by mohla sloužit jako marker aktivace systému vrozené imunity v souvislosti se systémovým „low-grade zánětem“ provázejícím metabolický syndrom i aterosklerózu; a mohla by být prediktorem rozvoje makro- i mikro-vaskulárních komplikací u diabetes mellitus, ale i celiakie a dalších chorob spojených s poruchou intestinální bariérové funkce.

Přes rozsáhlé studium patofyziologického vztahu intestinální bariéry k řadě autoimunitních i metabolických onemocnění trvá zásadní nejistota, zda porucha bariérové funkce tenkého střeva je příčinou či důsledkem nebo jen epifenomémem zmíněných onemocnění. Prohlubující se znalosti mechanismů zahrnutých v regulaci intestinální bariéry

však naznačují, že vhodné dietní manipulace, podávání prebiotik a probiotik by mohly příznivým způsobem ovlivnit bludný kruh porušené intestinální bariéry, „low-grade“ systémového zánětu, inzulínové rezistence a aterosklerózy. Už nyní se ukazuje, že např. anti-inflamatorní dieta podobné příznivé efekty vykazuje. Zásadní vliv diety na zdraví zdůrazňuje i nutnost propojení medicíny se zemědělským a potravinářským průmyslem v boji proti narůstajícím metabolickým i autoimunitním chorobám.



## 6. SOUHRN

**Úvod:** Porucha bariérové funkce tenkého střeva je zapojena v patogenezi imunitně mediovaných chorob (jakými jsou diabetes mellitus 1. typu či celiakie) a metabolických onemocnění (jakým je diabetes mellitus 2. typu)

**Cíle práce:** Prvním cílem práce bylo ověřit přítomnost poruchy epitelové bariéry tenkého střeva u obou typů diabetes mellitus a popsat eventuální rozdíly oproti celiakii, která je typickým onemocněním provázeným poruchou integrity intestinální bariéry. Druhým cílem bylo posoudit korelaci mezi poruchou intestinální bariéry a dobou trvání či kompenzací diabetes mellitus u pacientů s oběma typy diabetes a body mass indexem u pacientů s diabetes mellitus 2. typu. Třetím cílem bylo u pacientů s celiakií posoudit vliv bezlepkové diety na zlepšení integrity slizniční vrstvy tenkého střeva.

**Metodika:** Do studie bylo zahrnuto 166 jedinců včetně zdravé kontrolní skupiny a pěti patientských skupin s následujícími onemocněními: diabetes mellitus 1. typu s vyhaslou inzulinitidou (T1D), diabetes mellitus 1. typu s probíhající inzulinitidou (T1D/INS), diabetes mellitus 2. typu (T2D), recentně diagnostikovaná, tj. neléčená celiakie (CLD) a celiakie léčená bezlepkovou dietou (CLD-GFD). V séru uvedených jedinců jsme testovali marker apoptózy epitelových buněk – cytokeratin 18 caspase-cleaved fragment (cCK-18), marker poškození enterocytů – intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) a marker aktivace systému vrozené imunity – solubilní CD14 (sCD14). Ke statistické analýze byl užit Mann-Whitneyův U test a Pearsonovy korelační koeficienty.

**Výsledky:** Statisticky signifikantně zvýšené sérové hladiny cCK-18 a I-FABP jsme prokázali u pacientů s T1D a T2D ( $p < 0,001$ ) a rovněž u pacientů s T1D/INS ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ). Nebyla prokázána přesvědčivá korelace mezi testovanými markery a dobou trvání či kompenzací diabetes mellitus, resp. body mass indexem v případě T2D. U pacientů s CLD byly nalezeny statisticky signifikantně zvýšené sérové hladiny cCK-18 ( $p < 0,001$ ), I-FABP ( $p < 0,01$ ) a sCD14 ( $p < 0,05$ ) ve srovnání s kontrolní skupinou. Navíc jsme ukázali, že sérové hladiny cCK-18 ( $p < 0,01$ ) a I-FABP ( $p < 0,01$ ) byly statisticky signifikantně zvýšené i u pacientů s CLD-GFD ve srovnání s kontrolní skupinou.

**Závěry:** Potvrdili jsme přítomnost poruchy epitelové bariéry tenkého střeva u pacientů s diabetes mellitus 1. a 2. typu a současně jsme ukázali, že tato porucha je mírnějšího stupně, než je tomu u celiakie. V případě pacientů s celiakií jsme prokázali reziduální poruchu intestinální bariéry i přes striktní dodržování bezlepkové diety. Jako první jsme dokumentovali séropozitivitu sCD14 u pacientů s neléčenou celiakií. Na základě našich výsledků považujeme zejména I-FABP za neinvazivní marker poškození intestinální bariéry u pacientů s diabetes mellitus obou typů i u celiakie.

## 7. SUMMARY

**Introduction:** Impairment of intestinal barrier function is involved in pathogenesis of immune mediated diseases (such as type 1 diabetes mellitus or celiac disease) and metabolic diseases (such as type 2 diabetes mellitus).

**Aims of study:** The first aim was to analyze impairment of mucosal part of intestinal barrier in both type of diabetes and to describe differences when compared to celiac disease, which is a typical condition associated with impairment of intestinal barrier function. The second aim was to find a correlation between duration or compensation of diabetes and intestinal barrier desintegration in patients with both type of diabetes, and to find a correlation between body mass index and intestinal barrier desintegration in patients with type 2 diabetes. The third aim was to assess influence of gluten-free diet on improvement of small intestinal mucosal integrity in patient with celiac disease.

**Methods:** The study was performed on 166 individuals including healthy controls and five group of patients with: type 1 diabetes mellitus with fading insulinitis (T1D), type 1 diabetes mellitus with ongoing insulinitis (T1D/INS), type 2 diabetes mellitus (T2D), untreated celiac disease (CLD), and celiac disease on gluten-free diet (CLD-GFD). We tested the marker of epithelial apoptosis – cytokeratin 18 caspase-cleaved fragment (cCK-18), marker of enterocyte damage – intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) and marker of activation of innate immunity – soluble CD14 (sCD14) in sera of studied individuals. Mann-Whitney U test and Pearson correlation coefficients were used for statistical analyses.

**Results:** We found elevated levels of cCK-18 and I-FABP in T1D and T2D ( $p < 0.001$ ), and T1D/INS ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). No convincing relationships were observed between tested markers and duration or compensation of diabetes, or BMI in T2D patients. In CLD, we found elevated levels of cCK-18 ( $p < 0.001$ ), I-FABP ( $p < 0.01$ ) and sCD14 ( $p < 0.05$ ) when compared to healthy controls. Moreover, the levels of cCK-18 ( $p < 0.01$ ) and I-FABP ( $p < 0.01$ ) in CLD-GFD were higher when compared with controls.

**Conclusion:** We confirmed the impairment of intestinal mucosal barrier integrity in type 1 and type 2 diabetes mellitus, which is of milder degree when compared to untreated celiac disease. Moreover, we found residual impairment of intestinal mucosal barrier integrity in

celiac disease treated with gluten-free diet. We documented for the first time seropositivity for sCD14 in untreated celiac disease, and potential usefulness of serum I-FABP as marker of small intestinal damage in diabetes of both types and in celiac disease.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABREU, M. T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews. Immunology*. 2010, **10**(2), 131–144. ISSN 1474-1733. DOI: 10.1038/nri2707.
- ADACHI, T.; MORI, C.; SAKURAI, K.; SHIHARA, N.; TSUDA, K. A. K. YASUDA. Morphological changes and increased sucrase and isomaltase activity in small intestines of insulin-deficient and type 2 diabetic rats. *Endocrine Journal*. 2003, **50**(33), 271–279. ISSN 0918-8959.
- ADRIAANSE, M. P.; TACK, G. J.; PASSOS, V. L.; DAMOISEAUX, J. G.; SCHREURS M. W.; VAN WIJCK, K.; RIEDL, R. G.; MASCLÉE, A. A.; BUURMAN, W. A.; MULDER, C. J. A. C. VREUGDENHIL. Serum I-FABP as marker for enterocyte damage in coeliac disease and its relation to villous atrophy and circulating autoantibodies. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2013, **37**(4), 482–490. ISSN 0269-2813. DOI: 10.1111/apt.12194.
- AKERBLOM, H. K.; VIRTANEN, S. M.; ILOINEN, J.; SAVILAHTI, E.; VAARALA, O.; REUNANEN, A.; TERAMO, K.; HÄMÄLÄINEN, A. M.; PARONEN, J.; RIIKJÄRV, M. A.; ORMISSON, A.; LUDVIGSSON, J.; DOSCH, H. M.; HAKULINEN, T. a M. KNIP. Dietary manipulation of beta cell autoimmunity in infants at increased risk of type 1 diabetes: a pilot study. *Diabetologia*. 2005, **48**(5), 829–837. ISSN 0012-186X.
- ALAM, C.; VALKONEN, S.; PALAGANI, V.; JALAVA, J.; EEROLA, E. a A. HANNINEN. Inflammatory tendencies and overproduction of IL-17 in the colon of young NOD mice are counteracted with diet change. *Diabetes*. 2010, **59**(9), 2237–2246. ISSN 0012-1797. DOI: 10.2337/db10-0147.
- ALKANANI, A. K.; REWERS, M.; DONG, F.; WAUGH, K.; GOTTLIEB, P. A. a D. ZIPRIS. Dysregulated Toll-like receptor-induced interleukin-1beta and interleukin-6 responses in subjects at risk for the development of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2012, **61**(10), 2525–2533. ISSN 0012-1797.
- AMAR, J.; BURCELIN, R.; RUIDAVETS, J. B.; CANI, P. D.; FAUVEL, J.; ALESSI, M. C.; CHAMONTIN, B. a J. FERRIÉRES. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2008, **87**(5), 1219–1223. ISSN 0002-9165.
- ANDĚL, M.; POLÁK, J.; KRAML, P.; DLOUHÝ, P. a V. ŠTICH. Chronický mírný zánět spojuje obezitu, metabolický syndrom, aterosklerózu a diabetes. *Vnitřní lékařství*. 2009, **55**(7–8), 659–665. ISSN 0042-773X.
- ANDERSON, J. M. a C. M. VAN ITALLIE. Physiology and function of the tight junction. *Cold Springs Harbor Perspectives in Biology*. 2009; **1**(2), a002584. ISSN 1943-0264. DOI: 10.1101/cshperspect.a002584.
- ANDERSON, P. D.; MEHTA, N. N.; WOLFE, M. L.; HINKLE, C. C.; PRUSCINO, L.; COMISKEY, L. L.; TABITA-MARTINEZ, J.; SELLERS, K. F.; RICKELS, M. R.; AHIMA, R. S. a M. P. REILLY. Innate immunity modulates adipokines in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2007, **92**(6), 2272–2279. ISSN 0021-972X.
- ARIF, S.; MOORE, F.; MARKS, K.; BOUCKENOOGHE, T.; DAYAN, C. M.; PLANAS, R.; VIVES-PI, M.; POWRIE, J.; TREE, T.; MARCHETTI, P.; HUANG, G. C.; GURZOV, E. N.; PUJOL-BORRELL, R.; EIZIRIK, D. L. a M. PEAKMAN. Peripheral and islet interleukin-17 pathway activation characterizes human autoimmune diabetes and promotes cytokine-mediated beta-cell death. *Diabetes*. 2011, **60**(8), 2112–2119. ISSN 0012-1797. DOI: 10.2337/db10-1643.
- ARRANZ, E. BODE, J.; KINGSTONE, K. a A. FERGUSON. Intestinal antibody pattern of coeliac disease: association with gamma/delta T cell receptor expression by intraepithelial lymphocytes, and other indices of potential coeliac disease. *Gut*. 1994, **35**(4), 476–482. ISSN 0017-5749.
- ARRIETA, M. C.; BISTRITZ, L. a J. B. MEDDINGS. Alterations in intestinal permeability. *Gut*. 2006, **55**(10), 1512–1520. ISSN 0017-5749.
- AURICCHIO, R.; PAPARO, F.; MAGLIO, M.; FRANZESE, A.; LOMBARDI, F.; VALERIO, G.; NARDONE, G.; PERCOPO, S.; GRECO, L. a R. TRONCONE. In vitro-déranged intestinal immune response to gliadin in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2004, **53**(7), 1680–1683. ISSN 0012-1797.
- BACKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L. V.; KOH, G. Y.; NAGY, A.; SEMENKOVICH, C. F. a J. I. GORDON. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004, **101**(44), 15718–15723. ISSN 0027-8424.
- BADAMI, E.; SORINI, C.; COCCIA, M.; USUELLI, V.; MOLTENI, L.; BOLLA, A. M.; SCAVINI, M.; MARIANI, A.; KING, C.; BOSI, E. a M. FALCONE. Defective differentiation of regulatory FoxP3+ T cells by small-intestinal dendritic cells in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011, **60**(8), 2120–2124. ISSN 0012-1797. DOI: 10.2337/db10-1201.
- BAGGIO, L. L. a D. J. DRUCKER. Harnessing the therapeutic potential of glucagon-like peptide-1: a critical review. *Treatments in Endocrinology*. 2002, **1**(2), 117–125. ISSN 1175-6349.
- BANTEL, H.; RUCK, P.; GREGOR, M. a K. SCHULZE-OSTHOFF. Detection of elevated caspase activation and early apoptosis in liver diseases. *European Journal of Cell Biology*. 2001, **80**(3), 230–239. ISSN 0171-9335.
- BARCLAY, G. R. Endotoxin-core antibodies: time for a reappraisal? *Intensive Care Medicine*. 1999, **25**(5), 427–429. ISSN 0342-4642.
- BAUMGART, D. C. a A. U. DIGNASS. Intestinal barrier function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2002, **5**(1), 685–694. ISSN 0091-6749. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.05.038.

- BEITNES, A. R.; RÁKI, M.; BROTTVEIT, M.; LUNDIN, K. E.; JAHNSEN F. L. A. L. M. SOLLID. Rapid accumulation of CD14+CD11c+ dendritic cells in gut mucosa of celiac disease after in vivo gluten challenge. *PLoS One*. 2012, **7**(3), e33556. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0033556.
- BEYAN, H.; GOODIER, M. R.; NAWROLY, N. S.; HAWA, M. I.; BUSTIN, S. A.; OGUNKOLADE, W. B.; LONDEI, M.; YOUSAF, N. a R. D. LESLIE. Altered monocyte cyclooxygenase response to lipopolysaccharide in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2006, **55**(12), 3439–3445. ISSN 0012-1797.
- BJORNSTAD, P.; SNELL-BERGEON, J. K.; NADEAU, K. J. a D. M. MAAHS. Insulin sensitivity and complications in type 1 diabetes: New insights. *World Journal of Diabetes*. 2015, **6**(1), 8–16. ISSN 1948-9358. DOI: 10.4239/wjd.v6.i1.8.
- BORODY, T. J. a A. KHORUTS. Fecal microbiota transplantation and emerging applications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2012, **9**(2), 88–96. ISSN 1759-5045. DOI: 10.1038/nrgastro.2011.244.
- BOSCARDIN, S. B.; HAFALLA, J. C.; MASILAMANI, R. F.; KAMPHORST, A. O.; ZEBROSKI, H. A.; RAI, U.; MORROT, A.; ZAVALA, F.; STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, R. S. a M. C. NUSSENZWEIG. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *Journal of Experimental Medicine*. 2006, **203**(3), 599–606. ISSN 0022-1007.
- BOSI, E.; MOLteni, L.; RADAELLI, M. G.; FOLINI, L.; FERMO, I.; BAZZIGALUPPI, E.; PIEMONTI, L.; PASTORE, M. R. a R. PARONI. Increased intestinal permeability precedes clinical onset of type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2006, **49**(12), 2824–2827. ISSN 0012-186X.
- BROUGHTON, S. E.; PETERSEN, J.; THEODOSSIS, A.; SCALLY, S. W.; LOH, K. L.; THOMPSON, A.; VAN BERGEN, J.; KOOY-WINKELAAR, Y.; HENDERSON, K. N.; BEDDOE, T.; TYE-DIN, J. A.; MANNERING, S. I.; PURCELL, A. W.; MCCLUSKEY, J.; ANDERSON, R. P.; KONING, F.; REID, H. H. a J ROSSJOHN. Biased T cell receptor usage directed against human leukocyte antigen DQ8-restricted gliadin peptides is associated with celiac disease. *Immunity*. 2012, **37**(4), 611–621. ISSN 1074-7613. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.07.013.
- BRUEWER, M.; UTECH, M.; IVANOV, A. I.; HOPKINS, A. M.; PARKOS, C. A. a A. NUSRAT. Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *FASEB Journal*. 2005, **19**(8), 923–933. ISSN 0892-6638.
- BRUGMAN, S.; KLATTER, F. A.; VISSER, J. T.; WILDEBOER-VELOO, A. C.; HARMSEN, H. J.; ROZING, J. a N. A. BOS. Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? *Diabetologia*. 2006, **49**(9), 2105–2108. ISSN 0012-186X.
- BULLEN, T. F.; FORREST, S.; CAMPBELL, F.; DODSON, A. R.; HERSHMAN, M. J.; PRITCHARD, D. M.; TURNER, J. R.; MONTROSE, M. H. a A. J. WATSON. Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine. *Laboratory Investigation*. 2006, **86**(10), 1052–1063. ISSN 0023-6837.
- BUSCHARD, K.; PEDERSEN, C.; HANSEN, S. V.; HAGEMAN, I.; AAEN, K. a K. BENDTZEN. Anti-diabetogenic effect of fusidic acid in diabetes prone BB rats. *Autoimmunity*. 1992, **14**(2), 101–104. ISSN 0891-6934.
- CANI, P. D. a N. M. DELZENNE. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2007, **10**(6), 729–734. ISSN 1363-1950.
- CANI, P. D.; AMAR, J.; IGLESIAS, M. A.; POGGI, M.; KNAUF, C.; BASTELICA, D.; NEYRINCK, A. M.; FAVA, F.; TUOHY, K. M.; CHABO, C.; WAGET, A.; DELMÉE, E.; COUSIN, B.; SULPICE, T.; CHAMONTIN, B.; FERRIÈRES, J.; TANTI, J. F.; GIBSON, G. R.; CASTEILLA, L.; DELZENNE, N. M.; ALESSI, M. C. a R. BURCELIN. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007a, **56**(7), 1761–1772. ISSN 0012-1797.
- CANI, P. D.; BIBILONI, R.; KNAUF, C.; WAGET, A.; NEYRINCK, A. M.; DELZENNE, N. M. a R. BURCELIN. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008a, **57**(6), 1470–1481. ISSN 0012-1797. DOI: 10.2337/db07-1403.
- CANI, P. D.; DELZENNE, N. M.; AMAR, J. a R. BURCELIN. Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathologie-Biologie*. 2008b, **56**(5), 305–309. ISSN 0369-8114. DOI: 10.1016/j.patbio.2007.09.008.
- CANI, P. D.; HOSTE, S.; GUIOT, Y. a N. M. DELZENNE. Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. *British Journal of Nutrition*. 2007b, **98**(1), 32–37. ISSN 0007-1145.
- CANI, P. D.; KNAUF, C.; IGLESIAS, M. A.; DRUCKER, D. J.; DELZENNE, N. M. a R. BURCELIN. Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. *Diabetes*. 2006, **55**(5), 1484–1490. ISSN 0012-1797.
- CANI, P. D.; LECOURT, E.; DEWULF, E. M.; SOHET, F. M.; PACHIKIAN, B. D.; NASLAIN, D.; DE BACKER, F.; NEYRINCK, A. M. a N. M. DELZENNE. Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satiety and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2009a, **90**(5), 1236–1243. ISSN 0002-9165. DOI: 10.3945/ajcn.2009.28095.
- CANI, P. D.; NEYRINCK, A. M.; FAVA, F.; KNAUF, C.; BURCELIN, R. G.; TUOHY, K. M.; GIBSON, G. R. a N. M. DELZENNE. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*. 2007c, **50**(11), 2374–2383. ISSN 0012-186X.

- CANI, P. D.; POSSEMIERS, S.; VAN DE WIELE, T.; GUIOT, Y.; EVERARD, A.; ROTTIER, O.; GEURTS, L.; NASLAIN, D.; NEYRINCK, A.; LAMBERT, D. M.; MUCCIOLI, G. G. a N. M. DELZENNE. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*. 2009b, **58**(8), 1091–1103. ISSN 0017-5749. DOI: 10.1136/gut.2008.165886.
- CARICILLI, A. M. a M. J. SAAD. The role of gut microbiota on insulin resistance. *Nutrients*. 2013, **5**(3), 829–851. ISSN 2072-6643. DOI: 10.3390/nu5030829.
- CARIO, E.; GERKEN, G. a D. K. PODOLSKY. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology*. 2004, **127**(1), 224–238. ISSN 0016-5085.
- CATALIOTO, R.; MAGGI, C. A. a S. GIULIANI. Intestinal epithelial barrier dysfunction in disease and possible therapeutical interventions. *Current Medicinal Chemistry*. 2011, **18**(3), 398–426. ISSN 0929-8673.
- CATASSI, C.; BONUCCI, A.; COPPA, G. V.; CARLUCCI, A. a P. L. GIORGI. Intestinal permeability changes during the first month: effect of natural versus artificial feeding. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 1995, **21**(4), 383–386. ISSN 0277-2116.
- COHEN, J. The detection and interpretation of endotoxaemia. *Intensive Care Medicine*. 2000, **26**(Suppl 1), S51-S56. ISSN 0342-4642.
- COOK, D. N.; PISETSKY, D. S. a D. A. SCHWARTZ. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature Immunology*. 2004, **5**(10), 975–979. ISSN 1529-2908.
- COOMBES, J. L. a F. POWRIE. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature Reviews. Immunology*. 2008, **8**(6), 435–446. ISSN 1474-1733. DOI: 10.1038/nri2335.
- CREELY, S. J.; MCTERNAN, P. G.; KUSMINSKI, C. M.; FISHER, M.; DA SILVA, N. F.; KHANOLKAR, M.; EVANS, M.; HARTE, A. L. a S. KUMAR. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2007, **292**(3), E740-E747. ISSN 0193-1849.
- CRENN, P.; MESSING, B. a L. CYNBER. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clinical Nutrition*. 2008, **27**(3), 328–339. ISSN 0261-5614. DOI: 10.1016/j.clnu.2008.02.005.
- CUMMINS, A. G.; ALEXANDER, B. G.; CHUNG, A.; TEO, E.; WOENIG, J. A.; FIELD, J. B.; THOMPSON, F. M. a I. C. ROBERTS-THOMSON. Morphometric evaluation of duodenal biopsies in celiac disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2011, **106**(1), 145–150. ISSN 0002-9270. DOI: 10.1038/ajg.2010.313.
- DAHLQUIST, G. Can we slow the rising incidence of childhood-onset autoimmune diabetes? The overload hypothesis. *Diabetologia*. 2006, **49**(1), 20–24. ISSN 0012-186X.
- DAMCI, T.; NUHOGLU, I.; DEVRANOGLU, G.; OSAR, Z.; DEMIR, M. a H ILKOVA. Increased intestinal permeability as a cause of fluctuating postprandial blood glucose levels in Type 1 diabetic patients. *European Journal of Clinical Investigation*. 2003, **33**(5), 397–401. ISSN 0014-2972.
- DASU, M. R.; DEVARAJ, S.; PARK, S. a I. JIALAL. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2010, **33**(4), 861–868. ISSN 0149-5992. DOI: 10.2337/dc09-1799.
- DASU, M. R.; DEVARAJ, S.; ZHAO, L.; HWANG, D. H. a I. JIALAL. High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes: mechanism of activation. *Diabetes*. 2008, **57**(11), 3090–3098. ISSN 0012-1797. DOI: 10.2337/db08-0564.
- DEMEO, M. T.; MUTLU, E. A.; KESHAVARZIAN A. a M. C. TOBIN. Intestinal permeation and gastrointestinal disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2002, **34**(3), 385–396. ISSN 0192-0790.
- DERIKX, J. P.; LUYER, M. D.; HEINEMAN E. a W. A. BUURMAN. Non-invasive markers of gut wall integrity in health and disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2010, **16**(42), 5272–5279. ISSN 1007-9327.
- DERIKX, J. P.; VREUGDENHIL, A. C.; VAN DEN NEUCKER, A. M.; GROOTJANS, J.; VAN BIJNEN, A. A.; DAMOISEAUX, J. G.; VAN HEURN, L. W.; HEINEMAN E. a W. A. BUURMAN. A pilot study on the noninvasive evaluation of intestinal damage in celiac disease using I-FABP and L-FABP. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2009, **43**(8), 727–733. ISSN 0192-0790. DOI: 10.1097/MCG.0b013e31819194b0.
- DEVARAJ, S.; DASU, M. R.; ROCKWOOD, J.; WINTER, W.; GRIFFEN, S. C. a I. JIALAL. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2008, **93**(2), 578–583. ISSN 0021-972X.
- DEVARAJ, S.; CHAN, E. a I. JIALAL. Direct demonstration of an antiinflammatory effect of simvastatin in subjects with the metabolic syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2006, **91**(11), 4489–4496. ISSN 0021-972X.
- DEVITT, A.; MOFFATT, O. D.; RAYKUNDALIA, C.; CAPRA, J. D.; SIMMONS, D. L. a C. D. GREGORY. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*. 1998, **392**(6675), 505–509. ISSN 0028-0836.
- DIAMANT, M.; BLAAK, E. E. a W. M. DE VOS. Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes? *Obesity Reviews*. 2011, **12**(4), 272–281. ISSN 1467-7881. DOI: 10.1111/j.1467-789X.2010.00797.x.

- DRUCKER, D. J. Biologic actions and therapeutic potential of the proglucagon-derived peptides. *Nature Clinical Practice. Endocrinology & Metabolism*. 2005, **1**(1), 22–31. ISSN 1745-8366.
- DRUCKER, D. J. The role of gut hormones in glucose homeostasis. *Journal of Clinical Investigation*. 2007, **117**(1), 24–32. ISSN 0021-9738.
- DVOŘÁK, K.; STRÍTESKÝ, J.; PETRTÝL, J.; VÍTEK, L.; ŠROUBKOVÁ, R.; LENÍČEK M.; ŠMÍD V.; HALUZÍK M. a R. BRŮHA. Use of non-invasive parameters of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in daily practice--an exploratory case-control study. *PLoS One*. 2014, **9**(10), e111551. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0111551.
- ELLIOTT, R.B. a J. M. MARTIN. Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB rat? *Diabetologia*. 1984, **26**(4), 297–299. ISSN 0012-186X.
- ERRIDGE, C.; ATTINA, T.; SPICKETT, C. M. a D. J. WEBB. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2007, **86**(5), 1286–1292. ISSN 0002-9165.
- ESTALL, J. L. a D. J. DRUCKER. Glucagon-like Peptide-2. *Annual Review of Nutrition*. 2006, **26**, 391–411. ISSN 0199-9885.
- FASANO, A. Intestinal permeability and its regulation by zonulin: diagnostic and therapeutic implications. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2012a, **10**(10), 1096–1100. ISSN 1542-3565. DOI: 10.1016/j.cgh.2012.08.012.
- FASANO, A. Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012b, **1258**(1), 25–33. ISSN 0077-8923 .DOI: 10.1111/j.1749-6632.2012.06538.x.
- FERNÁNDEZ-REAL, J. M.; PÉREZ DEL PULGAR, S.; LUCHE, E.; MORENO-NAVARRETE, J. M.; WAGET, A.; SERINO, M.; SORIANELLO, E.; SÁNCHEZ-PLA, A.; PONTAQUE, F. C.; VENDRELL, J.; CHACÓN, M. R.; RICART, W.; BURCELIN, R. a A. ZORZANO. CD14 modulates inflammation-driven insulin resistance. *Diabetes*. 2011, **60**(8), 2179–2186. ISSN 0012-1797. DOI: 10.2337/db10-1210.
- FOGELSTRAND, L.; HULTHE, J.; HULTEN, L. M.; WIKLUND, O. a B. FAGERBERG. Monocytic expression of CD14 and CD18, circulating adhesion molecules and inflammatory markers in women with diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetologia*. 2004, **47**(11), 1948–1952. ISSN 0012-186X.
- FORSBERG, G.; FAHLGREN, A.; HÖRSTEDT, P.; HAMMARSTRÖM, S.; HERNELL, O. a M. HAMMARSTRÖM. Presence of bacteria and innate immunity of intestinal epithelium in childhood celiac disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2004, **99**(5), 894–904. ISSN 0002-9270.
- FUKATA, M.; CHEN, A.; KLEPPER, A.; KRISHNAREDDY, S.; VAMADEVAN, A. S.; THOMAS, L. S.; XU, R.; INOUE, H.; ARDITI, M.; DANNENBERG, A. J. a M. T. ABREU. Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology*. 2006, **131**(3), 862–877. ISSN 0016-5085.
- FUKUHARA, T.; HYOGO, H.; OCHI, H.; FUJINO, H.; KAN, H.; NAESHIRO, N.; HONDA, Y.; MIYAKI, D.; KAWAOKA, T.; TSUGE, M.; HIRAMATSU, A.; IMAMURA, M.; KAWAKAMI, Y.; AIKATA, H. a K. CHAYAMA. Efficacy and safety of sitagliptin for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease with type 2 diabetes mellitus. *Hepatology*. 2014, **61**(130), 323–328. ISSN 0172-6390.
- FUNDA, D. P.; KAAS, A.; BOCK, T.; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H. a K. BUSCHARD. Gluten-free diet prevents diabetes in NOD mice. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 1999, **15**(5), 323–327. ISSN 1520-7552.
- FUNDA, D. P.; KAAS, A.; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ H. a K. BUSCHARD. Gluten-free but also gluten-enriched (gluten+) diet prevent diabetes in NOD mice; the gluten enigma in type 1 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2008, **24**(1), 59–63. ISSN 1520-7552.
- FUNDA, D. P.; TUČKOVÁ, L.; FARRÉ, M. A.; IWASE, T.; MORO, I. a H. TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ. CD14 is expressed and released as soluble CD14 by human intestinal epithelial cells in vitro: lipopolysaccharide activation of epithelial cells revisited. *Infection and Immunity*. 2001, **69**(6), 3772–3781. ISSN 0019-9567.
- GAO, Z.; YIN, J.; ZHANG, J.; WARD, R. E.; MARTIN, R. J.; LEFEVRE, M.; CEFALU, W. T. a J. YE. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*. 2009, **58**(7), 1509–1517. ISSN 0012-1797. DOI: 10.2337/db08-1637.
- GARRETT, W. S.; GORDON, J. I. a L. H. GLIMCHER. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell*. 2010, **140**(6), 859–870. ISSN 0092-8674. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.023.
- GHOSHAL, S.; WITTA, J.; ZHONG, J.; DE VILLIERS, W. a E. ECKHARDT. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *Journal of Lipid Research*. 2009, **50**(1), 90–97. ISSN 0022-2275. DOI: 10.1194/jlr.M800156-JLR200.
- GIONGO, A.; GANO, K. A.; CRABB, D. B.; MUKHERJEE, N.; NOVELO, L. L.; CASELLA, G.; DREW, J. C.; ILONEN, J.; KNIP, M.; HYÖTY, H.; VEIJOLA, R.; SIMELL, T.; SIMELL, O.; NEU, J.; WASSERFALL, C. H.; SCHATZ, D.; ATKINSON, M. A. a E. W. TRIPLETT. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *ISME Journal*. 2011, **5**(1), 82–91. ISSN 1751-7362. DOI: 10.1038/ismej.2010.92.
- GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A. a K. ESPOSITO. The effects of diet on inflammation: emphasis on the metabolic syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006, **48**(4), 677–685. ISSN 0735-1097.



- GONZALEZ-QUINTELA, A.; ALONSO, M.; CAMPOS, J.; VIZCAINO, L.; LOIDI, L. a F. GUDE. Determinants of serum concentrations of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the adult population: the role of obesity. *PLoS One*. 2013, **8**(1), e54600. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0054600.
- GRAHAM, K. L.; SANDERS, N.; TAN, Y.; ALLISON, J.; KAY, T. W. H. a B. S. COULSON. Rotavirus infection accelerates type 1 diabetes in mice with established insulinitis. *Journal of Virology*. 2008, **82**(13), 6139–6149. ISSN 0022-538X. DOI: 10.1128/JVI.00597-08.
- GRAHAM, S.; COURTOIS, P.; MALAISSE, W. J.; ROZING, J.; SCOTT, F. W. a A. M. MOWAT. Enteropathy precedes type 1 diabetes in the BB rat. *Gut*. 2004, **53**(10), 1437–1444. ISSN 0017-5749.
- GREGOR, M. F. a G. S. HOTAMISLIGIL. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual Review of Immunology*. 2011, **29**, 415–445. ISSN 0732-0582. DOI: 10.1146/annurev-immunol-031210-101322.
- GREINER, D. L.; ROSSINI, A. A. a J. P. MORDES. Translating data from animal models into methods for preventing human autoimmune diabetes mellitus: caveat emptor and primum non nocere. *Clinical Immunology*. 2001, **100**(2), 134–143. ISSN 1521-6616.
- GROOS, S.; REALE, E. a L. LUCIANO. General suitability of techniques for in situ detection of apoptosis in small intestinal epithelium. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*. 2003, **272**(2), 503–513. ISSN 1552-4884.
- GROOTJANS, J.; THUIJLS, G.; VERDAM, F.; DERIKX, J. P.; LENAERTS, K. a W. A. BUURMAN. Non-invasive assessment of barrier integrity and function of the human gut. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2010, **2**(3), 61–69. ISSN 1948-9366. DOI: 10.4240/wjgs.v2.i3.61.
- GROSCHWITZ, K. R. a S. P. HOGAN. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009, **124**(1), 3–20; quiz 21–22. ISSN 0091-6749. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.05.038.
- GUANDALINI, S. a A. ASSIRI. Celiac disease: a review. *JAMA Pediatrics*. 2014, **168**(3), 272–278. ISSN 2168-6203. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2013.3858.
- GUO, S.; AL-SADI, R.; SAID, H. M. a T. Y. MA. Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *American Journal of Pathology*. 2013, **182**(3), 375–387. ISSN 0002-9440. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.10.014.
- HAMER, H. M.; JONKERS, D. M.; BAST, A.; VANHOUTVIN, S. A.; FISCHER, M. A.; KODDE, A.; TROOST, F. J.; VENEMA, K. a R. J. BRUMMER. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. *Clinical Nutrition*. 2009, **28**(1), 88–93. ISSN 0261-5614. DOI: 10.1016/j.clnu.2008.11.002.
- HAMILTON, G. Cytokeratin 18 (CK18) and Caspase-Cleaved CK18 (ccCK18) as Response Markers in Anticancer Therapy. In: *Cytokeratins - Tools in Oncology* [online]. Feb 2012 [cit. 04.06.2015]. Dostupné z doi: 10.5772/39194.
- HANNINEN, A.; NURMELA, R.; MAKSIMOW, M.; HEINO, J.; JALKANEN, S. a C. KURTS. Islet beta-cell-specific T cells can use different homing mechanisms to infiltrate and destroy pancreatic islets. *American Journal of Pathology*. 2007, **170**(1), 240–250. ISSN 0002-9440.
- HANSEN, C. H.; NIELSEN, D. S.; KVERKA, M.; ZÁKOSTELSKÁ, Z.; KLIMEŠOVÁ, K.; HUDCOVIC, T.; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H. a A. K. HANSEN. Patterns of early gut colonization shape future immune responses of the host. *PLoS One*. 2012, **7**(3), e34043. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0034043.
- HERNAEZ, R.; LAZO, M.; BONEKAMP, S.; KAMEL, I.; BRANCATI, F. L.; GUALLAR, E. a J. M. CLARK. Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: a meta-analysis. *Hepatology*. 2011, **54**(3), 1082–1090. ISSN 0270-9139. DOI: 10.1002/hep.24452.
- HERRERA, D. J.; MORRIS, K.; JOHNSTON, C. a P. GRIFFITHS. Automated assay for plasma D-lactate by enzymatic spectrophotometric analysis with sample blank correction. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2008, **45**(Pt2), 177–183. ISSN 0004-5632. DOI: 10.1258/acb.2007.007088.
- HISAMATSU, T.; SUZUKI, M.; REINECKER, H.; NADEAU, W. J.; MCCORMICK, B. A. a D. K. PODOLSKY. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003, **124**(4), 993–1000. ISSN 0016-5085.
- HONEYMAN, M. C.; COULSON, B. S.; STONE, N. L.; GELLERT, S. A.; GOLDWATER, P. N.; STEELE, C. E.; COUPER, J. J.; TAIT, B. D.; COLMAN, P. G. A L. C. HARRISON. Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes*. 2000, **49**(8), 1319–1324. ISSN 0012-1797.
- HONEYMAN, M. C.; STONE, N. L.; FALK, B. A.; NEPOM, G. A L. C. HARRISON. Evidence for molecular mimicry between human T cell epitopes in rotavirus and pancreatic islet autoantigens. *Journal of Immunology*. 2010, **184**(4), 2204–2210. ISSN 0022-1767. DOI: 10.4049/jimmunol.0900709.
- HONKANEN, J.; NIEMINEN, J. K.; GAO, R.; LUOPAJARVI, K.; SALO, H. M.; ILONEN, J.; KNIP, M.; OTONKOSKI, T. a O. VAARALA. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *Journal of Immunology*. 2010, **185**(3), 1959–1967. ISSN 0022-1767. DOI: 10.4049/jimmunol.1000788.

- HOOPER, L. V. a A. J. MACPHERSON. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews. Immunology*. 2010, **10**(3), 159–169. ISSN 1474-1733. DOI: 10.1038/nri2710.
- HOOPER, L. V. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends in Microbiology*. 2004, **12**(3), 129–134. ISSN 0966-842X.
- HOTAMISLIGIL, G. S. a E. ERBAY. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nature Reviews. Immunology*. 2008, **8**(12), 923–934. ISSN 1474-1733. DOI: 10.1038/nri2449.
- HRNČIŘ, T.; ŠTĚPÁNKOVÁ, R.; KOZÁKOVÁ, H.; HUDCOVIC, T. a H. TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ. Gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet influence development of regulatory T cells: studies in germ-free mice. *BMC Immunology*. 2008, **9**(6), 65. ISSN 1471-2172. DOI: 10.1186/1471-2172-9-65.
- HUANG, W.; METLAKUNTA, A.; DEDOUSIS, N.; ZHANG, P.; SIPULA, I.; DUBE, J. J.; SCOTT, D. K. a R. M. O'DOHERTY. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes*. 2010, **59**(2), 347–357. ISSN 0012-1797.
- HUMMEL, M.; BONIFACIO, E.; NASERKE, H. E. a A. G. ZIEGLER. Elimination of dietary gluten does not reduce titers of type 1 diabetes-associated autoantibodies in high-risk subjects. *Diabetes Care*. 2002, **25**(7), 1111–1116. ISSN 0149-5992.
- HURLEY, J. C. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995, **8**(2), 268–292. ISSN 0893-8512.
- HUSBY, S.; KOLETZKO, S.; KORPONAY-SZABO, I. R.; MEARIN, M. L.; PHILLIPS, A.; SHAMIR, R.; TRONCONE, R.; GIERSIEN, K.; BRANSKI, D.; CATASSI, C.; LELGEMAN, M.; MÄKI, M.; RIBES-KONINCKX, C.; VENTURA, A. a K. P. ZIMMER. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2012, **54**(1), 136–160. ISSN 0277-2116. DOI: 10.1097/MPG.0b013e31821a23d0.
- CHEN, J.; ZHU, Y.; ZHENG, Q. a J. JIANG. Serum cytokeratin-18 in the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis: A meta-analysis. *Hepatology Research*. 2014, **44**(8), 854–862. ISSN 1386-6346. DOI: 10.1111/hepr.12197..
- IERARDI, E.; LOSURDO, G.; PISCITELLI, D.; GIORGIO, F.; SORRENTINO, C.; PRINCIPI, M.; MONTENEGRO, L.; AMORUSO, A. a A. DI LEO. Seronegative celiac disease: where is the specific setting? *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*. 2015, **8**(2), 110–116. ISSN 2008-2258.
- IVANOV, I. I.; ATARASHI, K.; MANEL, N.; BRODIE, E. L.; SHIMA, T.; KARAOZ, U.; WEI, D.; GOLDFARB, K. C.; SANTEE, C. A.; LYNCH, S. V.; TANOUE, T.; IMAOKA, A.; ITOH, K.; TAKEDA, K.; UMESAKI, Y.; HONDA, K. a D. R. LITTMAN. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*. 2009, **139**(3), 485–498. ISSN 0092-8674. DOI: 10.1016/j.cell.2009.09.033.
- JACOB, A. I.; GOLDBERG, P. K.; BLOOM, N.; DEGENSHEIN, G. A. a P. J. KOZINN. Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology*. 1977, **72**(6), 1268–1270. ISSN 0016-5085.
- JIALAL, I.; KAUR, H. a S. DEVARAJ. Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: a translational perspective. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2014a, **99**(1), 39–48. ISSN 0021-972X. DOI: 10.1210/jc.2013-3092.
- JIALAL, I.; RAJAMANI, U.; ADAMS-HUET, B. a H. KAUR. Circulating pathogen associated molecular pattern - binding proteins and High Mobility Group Box protein 1 in nascent metabolic syndrome: implications for cellular Toll-like receptor activity. *Atherosclerosis*. 2014b, **236**(1), 182–187. ISSN 0021-9150. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.06.022.
- JIANG, Q.; AKASHI, S.; MIYAKE, K. a H. R. PETTY. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *Journal of Immunology*. 2000, **165**(7), 3541–3544. ISSN 0022-1767.
- JOHNSON, G. B.; RIGGS, B. L. a J. L. PLATT. A genetic basis for the "Adonis" phenotype of low adiposity and strong bones. *FASEB Journal*. 2004, **18**(11), 1282–1284. ISSN 0892-6638.
- JONES, B. A. a G. J. GORES. Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. *American Journal of Physiology*. 1997, **273**(6 Pt 1), G1174-G1188. ISSN 0002-9513.
- JUNKER, Y.; ZEISSIG, S.; KIM, S.; BARISANI, D.; WIESER, H.; LEFFLER, D. A.; ZEVALLOS, V.; LIBERMANN, T. A.; DILLON, S.; FREITAG, T. L.; KELLY, C. P. a D. SCHUPPAN. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *Journal of Experimental Medicine*. 2012, **209**(13), 2395–2408. ISSN 0022-1007. DOI: 10.1084/jem.20102660.
- KAHN, S. E.; HULL, R. L. a K. M. UTZSCHNEIDER. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006, **444**(7121), 840–846. ISSN 0028-0836.
- KALLIOMAKI, M.; COLLADO, M. C.; SALMINEN, S. E. ISOLAURI. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2008, **87**(3), 534–538. ISSN 0002-9165.
- KARCZEWSKI, J.; TROOST, F. J.; KONINGS, I.; DEKKER, J.; KLEEREBEZEM, M.; BRUMMER, R. M. a J. M. WELLS. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects

- on the epithelial barrier. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2010, **298**(6), G851–G859. ISSN 0193-1857. DOI: 10.1152/ajpgi.00327.2009.
- KELLEY, S. L.; LUKK, T.; NAIR, S. K. a R. I. TAPPING. The crystal structure of human soluble CD14 reveals a bent solenoid with a hydrophobic amino-terminal pocket. *Journal of Immunology*. 2013, **190**(3), 1304–1311. ISSN 0022-1767. DOI: 10.4049/jimmunol.1202446.
- KLEESSEN, B.; HARTMANN, L. a M. BLAUT. Fructans in the diet cause alterations of intestinal mucosal architecture, released mucins and mucosa-associated bifidobacteria in gnotobiotic rats. *British Journal of Nutrition*. 2003, **89**(5), 597–606. ISSN 0007-1145.
- KLEMETTI, P.; SAVILAHTI, E.; ILONEN, J.; AKERBLUM, H. K. a O. VAARALA. T-cell reactivity to wheat gluten in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1998, **47**(1), 48–53. ISSN 0300-9475.
- KNIP, M.; VIRTANEN, S. M.; SEPPA, K.; ILONEN, J.; SAVILAHTI, E.; VAARALA, O.; REUNANEN, A.; TERAMO, K.; HÄMÄLÄINEN, A. M.; PARONEN, J.; DOSCH, H. M.; HAKULINEN, T. a H. K. AKERBLUM. Dietary intervention in infancy and later signs of beta-cell autoimmunity. *New England Journal of Medicine*. 2010, **363**(20), 1900–1908. ISSN 0028-4793. DOI: 10.1056/NEJMoa1004809.
- KOLB, H. a R. B. ELLIOTT. Increasing incidence of IDDM a consequence of improved hygiene? *Diabetologia*. 1994, **37**(7), 729. ISSN 0012-186X.
- KORT, S. de; KESZTHELYI, D. a A. M. MASCLEE. Leaky gut and diabetes mellitus: what is the link? *Obesity Reviews*. 2011, **12**(6), 449–458. ISSN 1467-7881. DOI: 10.1111/j.1467-789X.2010.00845.x.
- KOSKINEN, O.; COLLIN, P.; LINDFORS, K.; LAURILA, K.; MÄKI, M. a K. KAUKINEN. Usefulness of small-bowel mucosal transglutaminase-2 specific autoantibody deposits in the diagnosis and follow-up of celiac disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2010, **44**(7), 483–488. ISSN 0192-0790. DOI: 10.1097/MCG.0b013e3181b64557.
- KRAMER, G.; ERDAL, H.; MERTENS, H. J.; NAP, M.; MAUERMANN, J.; STEINER, G.; MARBERGER, M.; BIVÉN, K.; SHOSHAN, M. C. a S. LINDER. Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18. *Cancer Research*. 2004, **64**(5), 1751–1756. ISSN 0008-5472.
- KUČERA, P.; NOVÁKOVÁ, D.; BĚHANOVÁ, M.; NOVÁK, J.; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H. a M. ANDĚL. Gliadin, endomysial and thyroid antibodies in patients with latent autoimmune diabetes of adults (LADA). *Clinical and Experimental Immunology*. 2003, **133**(1), 139–143. ISSN 0009-9104. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2003.02205.x.
- KUITUNEN, M.; SAUKKONEN, T.; ILONEN, J.; AKERBLUM, H. K. a E. SAVILAHTI. Intestinal permeability to mannitol and lactulose in children with type 1 diabetes with the HLA-DQB1\*02 allele. *Autoimmunity*. 2002, **35**(5), 365–368. ISSN 0891-6934.
- KURPPA, K.; ASHORN, M.; ILTANEN, S.; KOSKINEN, L. L.; SAAVALAINEN, P.; KOSKINEN, O.; MÄKI, M. a K. KAUKINEN. Celiac disease without villous atrophy in children: a prospective study. *Journal of Pediatrics*. 2010, **157**(3), 373–80, 380.e1. ISSN 0022-3476. DOI: 10.1016/j.jpeds.2010.02.070.
- KVERKA M, a H.TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ. Two faces of microbiota in inflammatory and autoimmune diseases: triggers and drugs. *APMIS*. 2013, **121**(5), 403–421. ISSN 0903-4641. DOI: 10.1111/apm.12007.
- LAHDENPERÄ, A. I.; HÖLTTÄ, V.; RUOHTULA, T.; SALO, H. M.; ORIVUORI, L.; WESTERHOLM-ORMIO, M.; SAVILAHTI, E.; FÄLTH-MAGNUSSON, K.; HÖGBERG, L.; LUDVIGSSON, J. a O. VAARALA. Up-regulation of small intestinal interleukin-17 immunity in untreated coeliac disease but not in potential coeliac disease or in type 1 diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*. 2012, **167**(2), 226–234. ISSN 0009-9104. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04510.x.
- LAHDENPERÄ, A.; LUDVIGSSON, J.; FALTH-MAGNUSSON, K.; HOGBERG, L. a O. VAARALA. The effect of gluten-free diet on Th1-Th2-Th3-associated intestinal immune responses in celiac disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2011, **46**(5), 538–549. ISSN 0036-5521. DOI: 10.3109/00365521.2011.551888.
- LAITINEN, K.; POUSSA, T. a E. ISOLAURI. Probiotics and dietary counselling contribute to glucose regulation during and after pregnancy: a randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition*. 2009, **101**(11), 1679–1687. ISSN 0007-1145. DOI: 10.1017/S0007114508111461.
- LANZINI, A.; LANZAROTTO, F.; VILLANACCI, V.; MORA, A.; BERTOLAZZI, S.; TURINI, D.; CARELLA, G.; MALAGOLI, A.; FERRANTE, G.; CESANA, B. M. a C. RICCI. Complete recovery of intestinal mucosa occurs very rarely in adult coeliac patients despite adherence to gluten-free diet. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2009, **29**(12), 1299–1308. ISSN 0269-2813. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2009.03992.x.
- LAU, K.; BENITEZ, P.; ARDISSONE, A.; WILSON, T. D.; COLLINS, E. L.; LORCA, G.; LI, N.; SANKAR, D.; WASSERFALL, C.; NEU, J.; ATKINSON, M. A.; SHATZ, D.; TRIPLETT, E. W. a J. LARKIN 3rd. Inhibition of type 1 diabetes correlated to a *Lactobacillus johnsonii* N6.2-mediated Th17 bias. *Journal of Immunology*. 2011, **186**(6), 3538–3546. ISSN 0022-1767. DOI: 10.4049/jimmunol.1001864.
- LEBER, B.; TRIPOLT, N. J.; BLATTL, D.; EDER, M.; WASCHER, T. C.; PIEBER, T. R.; STAUBER, R.; SOURIJ, H.; OETTL, K. a V. STADLBAUER. The influence of probiotic supplementation on gut permeability in patients with metabolic

- syndrome: an open label, randomized pilot study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2012, **66**(10), 1110–1115. ISSN 0954-3007. DOI: 10.1038/ejcn.2012.103.
- LEE, A. S.; GIBSON, D. L.; ZHANG, Y.; SHAM, H. P.; VALLANCE, B. A. a J. P. DUTZ. Gut barrier disruption by an enteric bacterial pathogen accelerates insulinitis in NOD mice. *Diabetologia*. 2010, **53**(4), 741–748. ISSN 0012-186X. DOI: 10.1007/s00125-009-1626-y.
- LEERS, M. P.; BJÖRKLUND, V.; BJÖRKLUND, B.; JÖRNVALL, H. a M. NAP. An immunohistochemical study of the clearance of apoptotic cellular fragments. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2002, **59**(8), 1358–1365. ISSN 1420-682X.
- LI, M.; SONG, L. a X. QIN. Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2014, **18**(5), 749–758. ISSN 1582-1838. DOI: 10.1111/jcmm.12270.
- LI, Q.; ZHANG, Q.; WANG, M.; ZHAO, S.; MA, J.; LUO, N.; LI, N.; LI, Y.; XU, G. a J. LI. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of tight junction. *Clinical Immunology*. 2008, **126**(1), 67–80. ISSN 1521-6616.
- LIBBY, P.; RIDKER, P. M. a A. MASERI. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002, **105**(9), 1135–1143. ISSN 0009-7322.
- LIEN, E. a D. ZIPRIS. The role of Toll-like receptor pathways in the mechanism of type 1 diabetes. *Current Molecular Medicine*. 2009, **9**(1), 52–68. ISSN 1566-5240.
- LIKE, A. A.; GUBERSKI, D. L. a L. BUTLER. Influence of environmental viral agents on frequency and tempo of diabetes mellitus in BB/Wor rats. *Diabetes*. 1991, **40**(2), 259–262. ISSN 0012-1797.
- LITZMAN, J.; NECHVATÁLOVÁ, J.; XU, J.; TICHÁ, O.; VLKOVÁ, M. a Z. HEL. Chronic immune activation in common variable immunodeficiency (CVID) is associated with elevated serum levels of soluble CD14 and CD25 but not endotoxaemia. *Clinical and Experimental Immunology*. 2012, **170**(3), 321–332. ISSN 0009-9104. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2012.04655.x.
- LÖNNROT, M.; KORPELA, K.; KNIP, M.; ILONEN, J.; SIMELL, O.; KORHONEN, S.; SAVOLA, K.; MUONA, P.; SIMELL, T.; KOSKELA, P. a H. HYÖTY. Enterovirus infection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study. *Diabetes*. 2000, **49**(8), 1314–1318. ISSN 0012-1797.
- LUFT, T.; CONZELMANN, M.; BENNER, A.; RIEGER, M.; HESS, M.; STROHHAECCKER, U.; GÖRNER, M.; HEGENBART, U.; HO, A. D. a P. DREGER. Serum cytokeratin-18 fragments as quantitative markers of epithelial apoptosis in liver and intestinal graft-versus-host disease. *Blood*. 2007, **110**(13), 4535–4542. ISSN 0006-4971.
- LUNDIN, K. E. a L. M. SOLLID. Advances in coeliac disease. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2014, **30**, 154–162. ISSN 0267-1379. DOI: 10.1097/MOG.0000000000000041.
- LUOPAJARVI, K.; SAVILAHTI, E.; VIRTANEN, S. M.; ILONEN, J.; KNIP, M.; AKERBLUM, H. K. a O. VAARALA. Enhanced levels of cow's milk antibodies in infancy in children who develop type 1 diabetes later in childhood. *Pediatric Diabetes*. 2008, **9**(5), 434–441. ISSN 1399-543X. DOI: 10.1111/j.1399-5448.2008.00413.x.
- LUOTO, R.; LAITINEN, K.; NERMES, M. a E. ISOLAURI. Impact of maternal probiotic-supplemented dietary counselling on pregnancy outcome and prenatal and postnatal growth: a double-blind, placebo-controlled study. *British Journal of Nutrition*. 2010, **103**(12), 1792–1799. ISSN 0007-1145. DOI: 10.1017/S0007114509993898.
- MAAHS, D. M.; DANIELS, S. R.; DE FERRANTI, S. D.; DICHEK, H. L.; FLYNN, J.; GOLDSTEIN, B. I.; KELLY, A. S.; NADEAU, K. J.; MARTYN-NEMETH, P.; OSGANIAN, S. K.; QUINN, L.; SHAH, A. S. a E. URBINA. Cardiovascular disease risk factors in youth with diabetes mellitus: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2014, **130**(17), 1532–1558. ISSN 0009-7322. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000094.
- MACHADO, M. V. a H. CORTEZ-PINTO. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal. *Journal of Hepatology*. 2013, **58**(5), 1007–1019. ISSN 0168-8278. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.11.021.
- MAIURI, L.; CIACCI, C.; RICCIARDELLI, I.; VACCA, L.; RAIÀ, V.; AURICCHIO, S.; PICARD, J.; OSMAN, M.; QUARATINO, S. a M. LONDEI. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet*. 2003, **362**(9377), 30–37. ISSN 0140-6736.
- MARCHESE, A.; LOVATI, E.; BIAGI, F. a G. R. CORAZZA. Coeliac disease and type 1 diabetes mellitus: epidemiology, clinical implications and effects of gluten-free diet. *Endocrine*. 2013, **43**(1), 1–2. ISSN 1355-008X. DOI: 10.1007/s12020-012-9758-0.
- MARSH, M. N. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology*. 1992, **102**(1), 330–354. ISSN 0016-5085.
- MARTIN, G. R.; WALLACE, L. E. a D. L. SIGALET. Glucagon-like peptide-2 induces intestinal adaptation in parenterally fed rats with short bowel syndrome. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2004, **286**(6), G964-G972. ISSN 0193-1857.

- MASARONE, M.; FEDERICO, A.; ABENAVOLI, L.; LOGUERCIO, C. a M. PERSICO. Non alcoholic fatty liver: epidemiology and natural history. *Reviews on Recent Clinical Trials*. 2014, **9**(3), 126–133. ISSN 1574-8871.
- MAZMANIAN, S. K.; LIU, C. H.; TZIANABOS, A. O. a D. L. KASPER. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*. 2005, **122**(1), 107–118. ISSN 0092-8674.
- MEDDINGS, J. B.; JARAND, J.; URBANSKI, S. J.; HARDIN, J. a D. G. GALLG. Increased gastrointestinal permeability is an early lesion in the spontaneously diabetic BB rat. *American Journal of Physiology*. 1999, **276**(4 Pt 1), G951-G957. ISSN 0002-9513.
- MEYERS, A. J.; SHAH, R. R.; GOTTLIEB, P. A. a D. ZIPRIS. Altered Toll-like receptor signaling pathways in human type 1 diabetes. *Journal of Molecular Medicine*. 2010, **88**(12), 1221–1231. ISSN 0946-2716. DOI: 10.1007/s00109-010-0666-6.
- MO, H.; LIU, S.; ZHOU, Z.; TANG, W.; YAN, X.; HUANG, G.; LI, J. a Q. FENG. Change of serum soluble CD14 level in newly diagnosed type 2 diabetes and its significance. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban*. 2010, **35**(7), 699–704. ISSN 1672-7347. DOI: 10.3969/j.issn.1672-7347.2010.07.009.
- MOLMENTI, E. P.; ZIAMBARAS, T. a D. H. PERLMUTTER. Evidence for an acute phase response in human intestinal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1993, **268**(19), 14116–14124. ISSN 0021-9258.
- MONSUUR, A. J.; DE BAKKER, P. I.; ALIZADEH, B. Z.; ZHERNAKOVA, A.; BEVOVA, M. R.; STRENGMAN, E.; FRANKE, L.; VAN'T SLOT, R.; VAN BELZEN, M. J.; LAVRUSEN, I. C.; DIOSDADO, B.; DALY, M. J.; MULDER, C. J.; MEARIN, M. L.; MEIJER, J. W.; MEIJER, G. A.; VAN OORT, E.; WAPENAAR, M. C.; KOELEMAN, B. P. a C. WIJMENGA. Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nature Genetics*. 2005, **37**(12), 1341–1344. ISSN 1061-4036.
- MORDES, J. P.; BORTELL, R.; BLANKENHORN, E. P.; ROSSINI, A. A. a D. L. GREINERL. Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. *ILAR Journal*. 2004, **45**(3), 278–291. ISSN 1084-2020.
- MORLING, J. R.; FALLOWFIELD, J. A.; WILLIAMSON, R. M.; NEE, L. D.; JACKSON, A. P.; GLANCY, S.; REYNOLDS, R. M.; HAYES, P.C.; GUHA, I. N.; STRACHAN, M. W. a J. F. PRICE. Non-invasive hepatic biomarkers (ELF and CK18) in people with type 2 diabetes: the Edinburgh type 2 diabetes study. *Liver International*. 2014, **34**(8), 1267–1277. ISSN 1478-3223. DOI: 10.1111/liv.12385.
- MUKHERJEE, S.; VAISHNAVA, S. a L. V. HOOPER. Multi-layered regulation of intestinal antimicrobial defense. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008, **65**(19), 3019–3027. ISSN 1420-682X. DOI: 10.1007/s00018-008-8182-3.
- MURPHY, M. S.; EASTHAM, E. J.; NELSON, R.; PEARSON, A. D. a M. F. LAKER. Intestinal permeability in Crohn's disease. *Archives of Disease in Childhood*. 1989, **64**(3), 321–325. ISSN 0003-9888.
- MURRI, M.; LEIVA, I.; GOMEZ-ZUMAQUERO, J. M.; TINAHONES, F. J.; CARDONA, F.; SORIGUER, F. a M. I. QUEIPO-ORTUÑO. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Medicine*. 2013, **11**, 46. ISSN 1741-7015. DOI: 10.1186/1741-7015-11-46.
- MUSSO, G.; GAMBINO, R. a M. CASSADER. Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded? *Diabetes Care*. 2010, **33**(10), 2277–2284. ISSN 0149-5992. DOI: 10.2337/dc10-0556.
- MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. a G. PAGANO. A novel approach to control hyperglycemia in type 2 diabetes: sodium glucose co-transport (SGLT) inhibitors: systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Annals of Medicine*. 2012, **44**(4), 375–393. ISSN 0785-3890. DOI: 10.3109/07853890.2011.560181.
- MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. a G. PAGANO. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Annals of Medicine*. 2011, **43**(8), 617–649. ISSN 0785-3890. DOI: 10.3109/07853890.2010.518623.
- NAKARAI, H.; YAMASHITA, A.; NAGAYASU, S.; IWASHITA, M.; KUMAMOTO, S.; OHYAMA, H.; HATA, M.; SOGA, Y.; KUSHIYAMA, A.; ASANO, T.; ABIKO, Y. a F. NISHIMURA. Adipocyte-macrophage interaction may mediate LPS-induced low-grade inflammation: potential link with metabolic complications. *Innate Immunology*. 2012, **18**(1), 164–170. ISSN 1753-4259. DOI: 10.1177/1753425910393370.
- NEISH, A. S. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*. 2009, **136**(1), 65–80. ISSN 0016-5085.
- NETTLETON, J. A.; MATIJEVIC, N.; FOLLIS, J. L.; FOLSOM, A. R. a E. BOERWINKLE. Associations between dietary patterns and flow cytometry-measured biomarkers of inflammation and cellular activation in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Carotid Artery MRI Study. *Atherosclerosis*. 2010, **212**(1), 260–267. ISSN 0021-9150. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.04.026.
- NEU, J.; REVERTE, C. M.; MACKAY, A. D.; LIBONI, K.; TUHACEK-TENACE, L. M.; HATCH, M.; LI, N.; CAICEDO, R. A.; SCHATZ, D. A. a M. ATKINSON. Changes in intestinal morphology and permeability in the biobreeding rat before the onset of type 1 diabetes. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2005, **40**(5), 589–595. ISSN 0277-2116.

- NEYRINCK, A. M.; CANI, P. D.; DEWULF, E. M.; DE BACKER, F.; BINDELS, L. B. a N. M. DELZENNE. Critical role of Kupffer cells in the management of diet-induced diabetes and obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009, **385**(3), 351–356. ISSN 0006-291X. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.05.070.
- NILSSON, A. C.; OSTMAN, E. M.; HOLST, J. J. a I. M. BJÖRCK. Including indigestible carbohydrates in the evening meal of healthy subjects improves glucose tolerance, lowers inflammatory markers, and increases satiety after a subsequent standardized breakfast. *Journal of Nutrition*. 2008, **138**(4), 732–739. ISSN 0022-3166.
- NOKOFF, N. J.; REWERS, M. a M. CREE GREEN. The interplay of autoimmunity and insulin resistance in type 1 diabetes. *Discovery Medicine*. 2012, **13**(69), 115–122. ISSN 1539-6509.
- NORRIS, J. M.; BARRIGA, K.; KLINGENSMITH, G.; HOFFMAN, M.; EISENBARTH, G. S.; ERLICH, H. A. a M. REWERS. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA*. 2003, **290**(13), 1713–1720. ISSN 0098-7484.
- OHWAKI, K. a E. YANO. Body mass index as an indicator of metabolic disorders in annual health checkups among Japanese male workers. *Industrial Health*. 2009, **47**(6), 611–616. ISSN 0019-8366.
- OIKARINEN, M.; TAURIAINEN, S.; HONKANEN, T.; OIKARINEN, S.; VUORI, K.; KAUKINEN, K.; RANTALA, I.; MÄKI, M. a H. HYÖTY. Detection of enteroviruses in the intestine of type 1 diabetic patients. *Clinical and Experimental Immunology*. 2008, **151**(1), 71–75. ISSN 0009-9104.
- OIKARINEN, S.; MARTISKAINEN, M.; TAURIAINEN, S.; HUHTALA, H.; ILONEN, J.; VEIJOLA, R.; SIMELL, O.; KNIP, M. a H. HYÖTY. Enterovirus RNA in blood is linked to the development of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011, **60**(1), 276–279. ISSN 0012-1797. DOI: 10.2337/db10-0186.
- OLAYWI, M.; BHATIA, T.; ANAND, S. a S. SINGHAL. Novel anti-diabetic agents in non-alcoholic fatty liver disease: a mini-review. *Hepatology & Pancreatic Diseases International*. 2013, **12**(6), 584–588. ISSN 1499-3872.
- PACKER, S. C.; DORNHORST, A. a G. S. FROST. The glycaemic index of a range of gluten-free foods. *Diabetic Medicine*. 2000, **17**(9), 657–660. ISSN 0742-3071.
- PALMER, C.; BIK, E. M.; DIGIULIO, D. B.; RELMAN, D. A. a P. O. BROWNO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*. 2007, **5**(1), e177. ISSN 1544-9173. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050177.
- PALOVÁ-JELÍNKOVÁ, L.; DÁŇOVÁ, K.; DRAŠAROVÁ, H.; DVOŘÁK, M.; FUNDA, D.; FUNDOVÁ, P.; KOTRBOVÁ - KOZAK, A. K.; ČERNÁ, M.; KAMANOVÁ, J.; MARTIN, S. F.; FREUDENBERG, M. a L. TUČKOVÁ. Pepsin digest of wheat gliadin fraction increases production of IL-1 beta via TLR4/MyD88/TRIF/MAPK/NF-kappa B signaling pathway and an NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One*. 2013, **8**(4), e62426. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0062426.
- PALOVÁ-JELÍNKOVÁ, L.; ROŽKOVÁ, D.; PECHAROVÁ, B.; BÁRTOVÁ, J.; ŠEDIVÁ, A.; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H.; SPIŠEK, R. a L. TUČKOVÁ. Gliadin fragments induce phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. *Journal of Immunology*. 2005, **175**(10), 7038–7045. ISSN 0022-1767.
- PARNELL, J. A. a R. A. REIMER. Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2009, **89**(6), 1751–1759. ISSN 0002-9165. DOI: 10.3945/ajcn.2009.27465.
- PARONEN, J.; VAARALA, O.; SAVILAHTI, E.; SAUKKONEN, T. a H. K. AKERBLOM. Soluble adhesion molecules and oral antigen feeding in infants. *Pediatric Research*. 1996, **40**(2), 276–279. ISSN 0031-3998.
- PASTORE, M.; BAZZIGALUPPI, E.; BELLONI, C.; ARCOVIO, C.; BONIFACIO, E. a E. BOSI. Six months of gluten-free diet do not influence autoantibody titers, but improve insulin secretion in subjects at high risk for type 1 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2003, **88**(1), 162–165. ISSN 0021-972X.
- PELSERS, M. M.; HERMENS, W. T. a J. F. GLATZ. Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. *Clinica Chimica Acta*. 2005, **352**(1-2), 15–35. ISSN 0009-8981.
- PENDERS, J.; THUIS, C.; VINK, C.; STELMA, F. F.; SNIJDERS, B.; KUMMELING, I.; VAN DEN BRANDT, P. A. a E. E. STOBBERINGH. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*. 2006, **118**(2), 511–521. ISSN 0031-4005.
- PIIRAINEN, L.; PESOLA, J.; PESOLA, I.; KOMULAINEN, J. a O. VAARALA. Breastfeeding stimulates total and cow's milk-specific salivary IgA in infants. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2009, **20**(3), 295–298. ISSN 0905-6157. DOI: 10.1111/j.1399-3038.2008.00776.x.
- QATANANI, M. a M. A. LAZAR. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes & Development*. 2007, **21**(12), 1443–1455. ISSN 0890-9369.
- QIAO, S.; RÁKI, M.; GUNNARSEN, K. S.; LØSET, G. Å.; LUNDIN, K. E.; SANDLIE I. a L. M. SOLLID. Posttranslational modification of gluten shapes TCR usage in celiac disease. *Journal of Immunology*. 2011, **187**(6), 3064–3071. ISSN 0022-1767. DOI: 10.4049/jimmunol.1101526.
- QING, Q.; ZHANG, S.; CHEN, Y.; LI, R.; MAO, H. a Q. CHEN. High glucose-induced intestinal epithelial barrier damage is aggravated by syndecan-1 destruction and heparanase overexpression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2015, **19**(6), 1366–1374. ISSN 1582-1838. DOI: 10.1111/jcmm.12523.

- RAYNER, C. K. a M. HOROWITZ. Gastrointestinal motility and glycemic control in diabetes: the chicken and the egg revisited? *Journal of Clinical Investigation*. 2006, **116**(2), 299–302. ISSN 0021-9738.
- REPA, A.; KOZÁKOVÁ, H.; HUDCOVIC, T.; ŠTĚPÁNKOVÁ, R.; HRNČÍŘ, T.; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H.; POLLAK, A. a U. WIEDERMANN. Susceptibility to nasal and oral tolerance induction to the major birch pollen allergen Bet v 1 is not dependent on the presence of the microflora. *Immunology Letters*. 2008, **117**(1), 50–56. ISSN 0165-2478. DOI: 10.1016/j.imlet.2007.11.025.
- RICHARDSON, S. J.; WILLCOX, A.; BONE, A. J.; FOULIS, A. K. a N. G. MORGAN. The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2009, **52**(6), 1143–1151. ISSN 0012-186X. DOI: 10.1007/s00125-009-1276-0.
- ROESCH, L. F.; LORCA, G. L.; CASELLA, G.; GIONGO, A.; NARANJO, A.; PIONZIO, A. M.; LI, N.; MAI, V.; WASSERFALL, C. H.; SCHATZ, D.; ATKINSON, M. A.; NEU, J. a E. W. TRIPLETT. Culture-independent identification of gut bacteria correlated with the onset of diabetes in a rat model. *ISME Journal*. 2009, **3**(5), 536–548. ISSN 1751-7362. DOI: 10.1038/ismej.2009.5.
- RONCON-ALBUQUERQUE, R. jr.; MOREIRA-RODRIGUES, M.; FARIA, B.; FERREIRA, A. P.; CERQUEIRA, C.; LOURENÇO, A. P.; PESTANA, M.; VON HAFE, P. a A. F. LEITE-MOREIRA. Attenuation of the cardiovascular and metabolic complications of obesity in CD14 knockout mice. *Life Sciences*. 2008, **83**(13-14), 502–510. ISSN 0024-3205. DOI: 10.1016/j.lfs.2008.07.021.
- ROOK, G. A. a L. R. BRUNET. Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut*. 2005, **54**(3), 317–320. ISSN 0017-5749.
- ROSTOM, A.; DUBE, C.; CRANNEY, A.; SALOOJEE, N.; SY, R.; GARRITTY, C.; SAMPSON, M.; ZHANG, L.; YAZDI, F.; MAMALADZE, V.; PAN, I.; MACNEIL, J.; MACK, D.; PATEL, D. a D. MOHER. The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterology*. 2005, **128**(4 Suppl. 1), S38–S46. ISSN 0016-5085.
- RUBINO, F.; R'BIBO, S. L.; DEL GENIO, F.; MAZUMDAR, M. a T. E. MCGRAW. Metabolic surgery: the role of the gastrointestinal tract in diabetes mellitus. *Nature Reviews. Endocrinology*. 2010, **6**(2), 102–109. ISSN 1759-5029. DOI: 10.1038/nrendo.2009.268.
- RUBIO-TAPIA, A.; RAHIM, M. W.; SEE, J. A.; LAHR, B. D.; WU, T. a J. A. MURRAY. Mucosal recovery and mortality in adults with celiac disease after treatment with a gluten-free diet. *American Journal of Gastroenterology*. 2010, **105**(6), 1412–1420. ISSN 0002-9270. DOI: 10.1038/ajg.2010.10.
- RYBAK, A.; CUKROWSKA, B.; SOCHA, J. a P. SOCHA. Long term follow up of celiac disease-is atherosclerosis a problem? *Nutrients*. 2014, **6**(7), 2718–2729. ISSN 2072-6643. DOI: 10.3390/nu6072718.
- SAMUEL, B. S.; SHAITO, A.; MOTOIKE, T.; REY, F. E.; BACKHED, F.; MANCHESTER, J. K.; HAMMER, R. E.; WILLIAMS, S. C.; CROWLEY, J.; YANAGISAWA, M. aj. I. GORDON. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008, **105**(43), 16767–16772. ISSN 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0808567105.
- SANSONETTI, P. J. War and peace at mucosal surfaces. *Nature Reviews. Immunology*. 2004, **4**(12), 953–964. ISSN 1474-1733.
- SANTACRUZ, A.; MARCOS, A.; WARNBERG, J.; MARTI, A.; MARTIN-MATILLAS, M.; CAMPOY, C.; MORENO, L. A.; VEIGA, O.; REDONDO-FIGUERO, C.; GARAGORRI, J. M.; AZCONA, C.; DELGADO, M.; GARCÍA-FUENTES, M.; COLLADO, M. C. a Y. SANZ. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity*. 2009, **17**(10), 1906–1915. ISSN 1930-7381. DOI: 10.1038/oby.2009.112.
- SANTAOLALLA, R. a M. T. ABREU. Innate immunity in the small intestine. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2012, **28**(2), 124–129. ISSN 0267-1379. DOI: 10.1097/MOG.0b013e3283506559.
- SANTIAGO, J. L.; MARTÍNEZ, A.; NÚÑEZ, C.; DE LA CALLE, H.; FERNÁNDEZ-ARQUERO, M.; DE LA CONCHA, E. G. a E. URCELAY. Association of MYO9B haplotype with type 1 diabetes. *Human Immunology*. 2008, **69**(2), 112–115. ISSN 0198-8859. DOI: 10.1016/j.humimm.2008.01.003.
- SANYAL, A. J. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002, **123**(5), 1705–1725. ISSN 0016-5085.
- SAPONE, A.; BAI, J. C.; CIACCI, C.; DOLINSEK, J.; GREEN, P. H.; HADJIVASSILIOU, M.; KAUKINEN, K.; ROSTAMI, K.; SANDERS, D. S.; SCHUMANN, M.; ULLRICH, R.; VILLALTA, D.; VOLTA, U.; CATASSI, C. a A. FASANO. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Medicine*. 2012, **10**, 13. ISSN 1741-7015. DOI: 10.1186/1741-7015-10-13.
- SAPONE, A.; DE MAGISTRIS, L.; PIETZAK, M.; CLEMENTE, M. G.; TRIPATHI, A.; CUCCA, F.; LAMPIS, R.; KRYSZAK, D.; CARTENÌ, M.; GENEROSO, M.; IAFUSCO, D.; PRISCO, F.; LAGHI, F.; RIEGLER, G.; CARRATU, R.; COUNTS, D. a A. FASANO. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes*. 2006, **55**(5), 1443–1449. ISSN 0012-1797.
- SAVILAHTI, E.; ORMÄLÄ, T.; SAUKKONEN, T.; SANDINI-POHJAVUORI, U.; KANTELE, J. M.; ARATO, A.; IILONEN, J. a H. K. AKERBLUM. Jejuna of patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) show signs of immune activation. *Clinical and Experimental Immunology*. 1999, **116**(1), 70–77. ISSN 0009-9104.

- SBARBATI, A.; VALLETTA, E.; BERTINI, M.; CIPOLLI, M.; MORRONI, M.; PINELLI, L. a L. TATÒ. Gluten sensitivity and 'normal' histology: is the intestinal mucosa really normal? *Digestive and Liver Disease*. 2003, **35**(11), 768–773. ISSN 1590-8658.
- SCOTT, F. W.; ROWSELL, P.; WANG, G.; BURGHARDT, K.; KOLB, H. a S. FLOHÉ. Oral exposure to diabetes-promoting food or immunomodulators in neonates alters gut cytokines and diabetes. *Diabetes*. 2002, **51**(1), 73–78. ISSN 0012-1797.
- SECONDULFO, M.; IAFUSCO, D.; CARRATÙ, R.; DEMAGISTRIS, L.; SAPONE, A.; GENEROSO, M.; MEZZOGIOMO, A.; SASSO, F. C.; CARTENI, M.; DE ROSA, R.; PRISCO, F. a V. ESPOSITO. Ultrastructural mucosal alterations and increased intestinal permeability in non-celiac, type I diabetic patients. *Digestive and Liver Disease*. 2004, **36**(1), 35–45. ISSN 1590-8658.
- SHAKIL, A.; CHURCH, R. J. a S. S. RAO. Gastrointestinal complications of diabetes. *American Family Physician*. 2008, **77**(12), 1697–1702. ISSN 0002-838X.
- SHALIMAR, D. M.; DAS, P.; SREENIVAS, V.; GUPTA, S. D.; PANDA, S. K. a G. K. MAKHARIAK. Mechanism of villous atrophy in celiac disease: role of apoptosis and epithelial regeneration. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2013, **137**(9), 1262–1269. ISSN 0003-9985. DOI: 10.5858/arpa.2012-0354-OA.
- SHANG, L.; FUKATA, M.; THIRUNARAYANAN, N.; MARTIN, A. P.; ARNABOLDI, P.; MAUSSANG, D.; BERIN, C.; UNKELESS, J. C.; MAYER, L.; ABREU, M. T. a S. A. LIRA. Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria. *Gastroenterology*. 2008, **135**(2), 529–538. ISSN 0016-5085. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.04.020.
- SHAW, J. E.; SICREE, R. A. a P. Z. ZIMMET. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2010, **87**(1), 4–14. ISSN 0168-8227. DOI: 10.1016/j.diabres.2009.10.007.
- SHEN, J.; OBIN, M. S. a L. ZHAO. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Molecular Aspects of Medicine*. 2013, **34**(1), 39–58. ISSN 0098-2997. DOI: 10.1016/j.mam.2012.11.001.
- SHI, H.; KOKOEVA, M. V.; INOUE, K.; TZAMELI, I.; YIN, H. a J. S. FLIER. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 2006, **116**(11), 3015–3025. ISSN 0021-9738.
- SCHUPPAN, D. a K. ZIMMER. The diagnosis and treatment of celiac disease. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2013, **110**(49), 835–846. ISSN 1866-0452. DOI: 10.3238/arztebl.2013.0835.
- SCHWARTZ, R. F.; NEU, J.; SCHATZ, D.; ATKINSON, M. A. a C. WASSERFALL. Comment on: Brugman S et al. (2006) Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? *Diabetologia* 49:2105-2108. *Diabetologia*. 2007, **50**(1), 220–221. ISSN 0012-186X.
- SIGALET, D. L.; BAWAZIR, O.; MARTIN, G. R.; WALLACE, L. E.; ZAHARKO, G.; MILLER, A. a A. ZUBAIDI. Glucagon-like peptide-2 induces a specific pattern of adaptation in remnant jejunum. *Digestive Diseases and Sciences*. 2006, **51**(9), 1557–1566. ISSN 0163-2116.
- SOYUCEN, E.; GULCAN, A.; AKTUGLU-ZEYBEK, A. C.; ONAL, H.; KIYKIM, E. a A. AYDIN. Differences in the gut microbiota of healthy children and those with type 1 diabetes. *Pediatrics International*. 2014, **56**(3), 336–343. ISSN 1328-8067. DOI: 10.1111/ped.12243.
- SPRUSS, A.; KANURI, G.; WAGNERBERGER, S.; HAUB, S.; BISCHOFF, S. C. a I. BERGHEIM. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*. 2009, **50**(4), 1094–1104. ISSN 0270-9139. DOI: 10.1002/hep.23122.
- STENE, L. C.; OIKARINEN, S.; HYOTY, H.; BARRIGA, K. J.; NORRIS, J. M.; KLINGENSMITH, G.; HUTTON, J. C.; ERLICH, H. A.; EISENBARTH, G. S. a M. REWERS. Enterovirus infection and progression from islet autoimmunity to type 1 diabetes: the Diabetes and Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetes*. 2010, **59**(12), 3174–3180. ISSN 0012-1797. DOI: 10.2337/db10-0866.
- SUDO, N.; SAWAMURA, S.; TANAKA, K.; AIBA, Y.; KUBO, C. a Y. KOGA. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *Journal of Immunology*. 1997, **159**(4), 1739–1745. ISSN 0022-1767.
- SUMIDA, Y.; NAKAJIMA, A. a Y. ITOH. Limitations of liver biopsy and non-invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*. 2014, **20**(2), 475–485. ISSN 1007-9327. DOI: 10.3748/wjg.v20.i2.475.
- SZEBENI, B.; VERES, G.; DEZSOFI, A.; RUSAI, K.; VANNAY, A.; BOKODI, G.; VÁSÁRHELYI, B.; KORPONAY-SZABÓ, I. R.; TULASSAY, T. a A. ARATÓ. . Increased mucosal expression of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in coeliac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2007, **45**(2), 187–193. ISSN 0277-2116.
- ŠTULC, T.; ČEŠKA, R.; MARINOV, I. a J. ŠKRHA. The effect of simvastatin and fenofibrate on the expression of leukocyte adhesion molecules and lipopolysaccharide receptor CD14 in type 2 diabetes mellitus. *Neuro Endocrinology Letters*. 2012, **33**(Suppl 2), 73–77. ISSN 0172-780X.



- ŠTULC, T.; SVOBODOVÁ H.; KRUPÍČKOVÁ, Z.; DOLEŽALOVÁ, R.; MARINOV, I. a R. ČEŠKA. Rosiglitazone influences the expression of leukocyte adhesion molecules and CD14 receptor in type 2 diabetes mellitus patients. *Physiological Research*. 2014, **63**(Suppl 2), S293-S298. ISSN 0862-8408.
- TACK, G. J.; VERBEEK, W. H.; SCHREURS, M. W. a C. J. MULDER. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*. 2010, **7**(4), 204–213. ISSN 1759-5045. DOI: 10.1038/nrgastro.2010.23.
- TAPPING, R. I. a P. S. TOBIAS. Soluble CD14-mediated cellular responses to lipopolysaccharide. *Chemical Immunology*. 2000 **74**, 108–121. ISSN 1015-0145. DOI: 10.1159/000058751.
- TER STEEGE J.; BUURMAN W.; ARENDS JW.; FORGET P. Presence of inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, CD68, and CD14 in the small intestine in celiac disease. *Laboratory Investigation*. 1997, **77**(1), 29–36. ISSN 0023-6837.
- TERPSTRA, A. H. Effect of conjugated linoleic acid on body composition and plasma lipids in humans: an overview of the literature. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004, **79**(3), 352–361. ISSN 0002-9165.
- THUIJLS, G.; DERIKX, J. P.; DE HAAN, J.; GROOTJANS, J.; DE BRUÏNE, A.; MASCLEE, A. A.; HEINEMAN, E. a W. A. BUURMAN. Urine-based detection of intestinal tight junction loss. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2010, **44**(1), e14-19. ISSN 0192-0790. DOI: 10.1097/MCG.0b013e31819f5652.
- TIITTANEN M.; WESTERHOLM-ORMIO M.; VERKASALO M.; SAVILAHTI E. a O. VAARALA. Infiltration of forkhead box P3-expressing cells in small intestinal mucosa in coeliac disease but not in type 1 diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*. 2008, **152**(3), 498–507. ISSN 0009-9104. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2008.03662.x.
- TIITTANEN, M.; PARONEN, J.; SAVILAHTI, E.; VIRTANEN, S. M.; ILONEN, J.; KNIP, M.; AKERBLUM, H. K. a O. VAARALA. Dietary insulin as an immunogen and tolerogen. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2006, **17**(7), 538–543. ISSN 0905-6157.
- TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H. a J. MĚSTECKÝ. Účast slizničního imunitního systému a komensálních bakterií v alergii. *Alergie*. 2012, **14**(2), 124–133. ISSN 1212-3536.
- TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H.; ŠTĚPÁNKOVÁ, R.; HUDCOVIC, T.; TUČKOVÁ, L.; CUKROWSKA, B.; LODINOVÁ-ZÁDNÍKOVÁ, R.; ROSSMANN, P.; BÁRTOVÁ, J.; SOKOL, D.; FUNDA, D. P.; BOROVSÁ, D.; ŘEHÁKOVÁ, Z.; ŠINKORA, J.; HOFMAN, J.; DRASTICH, P. a A. KOKEŠOVÁ. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters*. 2004, **93**(2), 97–108. ISSN 0165-2478.
- TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H.; ŠTĚPÁNKOVÁ, R.; KOZÁKOVÁ, H.; HUDCOVIC, T.; VANNUCCI, L.; TUČKOVÁ, L.; ROSSMANN, P.; HRNČÍŘ, T.; KVERKA, M.; ZÁKOSTELSKÁ, Z.; KLIMEŠOVÁ, K.; PŘIBYLOVÁ, J.; BÁRTOVÁ, J.; SANCHEZ, D.; FUNDOVÁ, P.; BOROVSÁ, D.; SRŮTKOVÁ, D.; ZÍDEK, Z.; SCHWARZER, M.; DRASTICH, P. a D. P. FUNDA. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cellular & Molecular Immunology*. 2011, **8**(2), 110–120. ISSN 1672-7681. DOI: 10.1038/cmi.2010.67.
- TROY, S.; SOTY, M.; RIBEIRO, L.; LAVAL, L.; MIGRENNE, S.; FIORAMONTI, X.; PILLOT, B.; FAUVEAU, V.; AUBERT, R.; VIOLLET, B.; FORETZ, M.; LECLERC, J.; DUCHAMPT, A.; ZITOUN, C.; THORENS, B.; MAGNAN, C.; MITHIEUX, G. a F. ANDREELLI. Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metabolism*. 2008, **8**(3), 201–211. ISSN 1550-4131. DOI: 10.1016/j.cmet.2008.08.008.
- TSAI, C. H.; HILL, M.; ASA, S. L.; BRUBAKER, P. L. a D. J. DRUCKER. Intestinal growth-promoting properties of glucagon-like peptide-2 in mice. *American Journal of Physiology*. 1997, **273**(1 Pt 1), E77-E84. ISSN 0002-9513.
- TSUDA, M.; HOSONO, A.; YANAGIBASHI, T.; KIHARA-FUJIOKA, M.; HACHIMURA, S.; ITOH, K.; HIRAYAMA, K.; TAKAHASHI, K. a S. KAMINOGAWA. Intestinal commensal bacteria promote T cell hyporesponsiveness and down-regulate the serum antibody responses induced by dietary antigen. *Immunology Letters*. 2010, **132**(1-2), 45–52. ISSN 0165-2478. DOI: 10.1016/j.imlet.2010.05.007.
- TSUKUMO, D. M.; CARVALHO, B. M.; CARVALHO-FILHO, M. A. a M. J. SAAD. Translational research into gut microbiota: new horizons in obesity treatment. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 2009, **53**(2), 139–144. ISSN 0004-2730.
- TURLEY, S. J.; LEE, J.; DUTTON-SWAIN, N.; MATHIS, D. a C. BENOIST. Endocrine self and gut non-self intersect in the pancreatic lymph nodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005, **102**(49), 17729–17733. ISSN 0027-8424.
- TURNBAUGH, P. J.; BACKHED, F.; FULTON, L. a J. I. GORDON. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host & Microbe*. 2008, **3**(4), 213–223. ISSN 1931-3128. DOI: 10.1016/j.chom.2008.02.015.

- TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; MAHOWALD, M. A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E. R. a J. I. GORDON. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006, **444**(7122), 1027–1031. ISSN 0028-0836.
- TURNBAUGH, P. J.; RIDAURA, V. K.; FAITH, J. J.; REY, F. E.; KNIGHT, R. a J. I. GORDON. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science Translational Medicine*. 2009, **1**(6), 6ra14. ISSN 1946-6234. DOI: 10.1126/scitranslmed.3000322.
- TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews. Immunology*. 2009, **9**(11), 799–809. ISSN 1474-1733. DOI: 10.1038/nri2653.
- UENO, T.; TOI, M. a S. LINDER. Detection of epithelial cell death in the body by cytokeratin 18 measurement. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2005, **59**(Suppl 2), S359-S362. ISSN 0753-3322.
- VAARALA, O. Is it dietary insulin? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006, **1079**(1), 350–359. ISSN 0077-8923.
- VAARALA, O. Is the origin of type 1 diabetes in the gut? *Immunology and Cell Biology*. 2012, **90**(3), 271–276. ISSN 0818-9641. DOI: 10.1038/icb.2011.115.
- VAARALA, O. Leaking gut in type 1 diabetes. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2008, **24**(6), 701–706. ISSN 0267-1379. DOI: 10.1097/MOG.0b013e32830e6d98.
- VAARALA, O.; ATKINSON, M. A. a J. NEU J. The "perfect storm" for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes*. 2008, **57**(10), 2555–2562. ISSN 0012-1797. DOI: 10.2337/db08-0331.
- VAARALA, O.; ILONEN, J.; RUOHTULA, T.; PESOLA, J.; VIRTANEN, S. M.; HÄRKÖNEN, T.; KOSKI, M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O.; POUSSA, T.; JÄRVENPÄÄ, A. L.; KOMULAINEN, J.; LOUNAMAA, R.; AKERBLOM, H. K. a M. KNIP. Removal of Bovine Insulin From Cow's Milk Formula and Early Initiation of Beta-Cell Autoimmunity in the FINDIA Pilot Study. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. 2012, **166**(7), 608–614. ISSN 1072-4710. DOI: 10.1001/archpediatrics.2011.1559.
- VAARALA, O.; KLEMETTI, P.; SAVILAHTI, E.; REIJONEN, H.; ILONEN, J. a H. K. AKERBLOM. Cellular immune response to cow's milk beta-lactoglobulin in patients with newly diagnosed IDDM. *Diabetes*. 1996, **45**(2), 178–182. ISSN 0012-1797.
- VAARALA, O.; KNIP, M.; PARONEN, J.; HÄMÄLÄINEN, A. M.; MUONA, P.; VÄÄTÄINEN, M.; ILONEN, J.; SIMELL, O. a H. K. AKERBLOM. Cow's milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infants at genetic risk for type 1 diabetes. *Diabetes*. 1999, **48**(7), 1389–1394. ISSN 0012-1797.
- VAISHNAVA, S.; BEHRENDT, C. L.; ISMAIL, A. S.; ECKMANN, L. a L. V. HOOPER. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008, **105**(52), 20858–20863. ISSN 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0808723105.
- VALENTINI, L.; RAMMINGER, S.; HAAS, V.; POSTRACH, E.; WERICH, M.; FISCHER, A.; KOLLER, M.; SWIDSINSKI, A.; BERESWILL, S.; LOCHS, H. a J. D. SCHULZKE. Small intestinal permeability in older adults. *Physiological Reports*. 2014, **2**(4), e00281. ISSN 2051-817X. DOI: 10.14814/phy2.281.
- VALLADARES, R.; SANKAR, D.; LI, N.; WILLIAMS, E.; LAI, K.; ABDELGELIEL, A. S.; GONZALEZ, C. F.; WASSERFALL, C. H.; LARKIN, J.; SCHATZ, D.; ATKINSON, M. A.; TRIPLETT, E. W.; NEU, J. a G. L. LORCA. *Lactobacillus johnsonii* N6.2 mitigates the development of type 1 diabetes in BB-DP rats. *PLoS One*. 2010, **5**(5), e10507. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0010507.
- VAN AUTREVE, J. E.; WEETS, I.; GULBIS, B.; VERTONGEN, F.; GORUS, F. K. a B. J. VAN DER AUWERA. The rare HLA-DQA1\*03-DQB1\*02 haplotype confers susceptibility to type 1 diabetes in whites and is preferentially associated with early clinical disease onset in male subjects. *Human Immunology*. 2004, **65**(7), 729–736. ISSN 0198-8859.
- VAN NIEUWENHOVEN, M. A.; DE SWART, E. A.; VAN EIJK, H. M.; DEUTZ, N. E.; BROUNS, F. a R. J. BRUMMER. Effects of pre- and post-absorptive factors on the lactulose/rhamnose gut permeability test. *Clinical Science*. 2000, **98**(3), 349–353. ISSN 0143-5221.
- VANDE VOORT, J. L.; MURRAY, J. A.; LAHR, B. D.; VAN DYKE, C. T.; KRONING, C. M.; MOORE, S. B. a T. T. WU. Lymphocytic duodenitis and the spectrum of celiac disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2009, **104**(1), 142–148. ISSN 0002-9270. DOI: 10.1038/ajg.2008.7.
- VENTURA A.; MAGAZZU, G. a L. GRECO. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology*. 1999, **117**(2), 297–303. ISSN 0016-5085.
- VERDAM, F. J.; GREVE, J. W.; ROOSTA, S.; VAN EIJK, H.; BOUVY, N.; BUURMAN, W. A. a S. S. RENSEN. Small intestinal alterations in severely obese hyperglycemic subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2011, **96**(2), E379-E383. ISSN 0021-972X. DOI: 10.1210/jc.2010-1333.
- VILA, I. K.; BADIN, P.-M.; MARQUES, M. A.; MONBRUN, L.; LEFORT, C.; MIR, L.; LOUCHE, K.; BOURLIER, V.; ROUSSEL, B.; GUI, P.; GROBER, J.; ŠTICH, V.; ROSSMEISLOVÁ, L.; ZAKAROFF-GIRARD, A.; BOULOUMIÉ, A.; VIGUERIE, N.;

- MORO, C.; TAVERNIER, G. a D. LANGIN. Immune Cell Toll-like Receptor 4 Mediates the Development of Obesity- and Endotoxemia-Associated Adipose Tissue Fibrosis. *Cell Reports*. 2014, **7**(4), 1116-1129. ISSN 2211-1247. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.03.062
- VIRALLY-MONOD, M.; TIELMANS, D.; KEVORKIAN, J. P.; BOUHNIAK, Y.; FLOURIE, B.; POROKHOV, B.; AJZENBERG, C.; WARNET, A. a P. J. GUILLAUSSÉAU. Chronic diarrhoea and diabetes mellitus: prevalence of small intestinal bacterial overgrowth. *Diabetes & Metabolism*. 1998, **24**(6), 530-536. ISSN 1262-3636.
- VISSER, J. T.; LAMMERS, K.; HOOGENDIJK, A.; BOER, M. W.; BRUGMAN, S.; BEIJER-LIEFERS, S.; ZANDVOORT, A.; HARMSSEN, H.; WELLING, G.; STELLAARD, F.; BOS, N. A.; FASANO, A. a J. ROZING. 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*. 2010, **53**(12), 2621-2628. ISSN 0012-186X. DOI: 10.1007/s00125-010-1903-9.
- VIVES-PI, M.; SOMOZA, N.; FERNANDEZ-ALVAREZ, J.; VARGAS, F.; CARO, P.; ALBA, A.; GOMIS, R.; LABETA, M. O. a R. PUJOL-BORRELL. Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. *Clinical and Experimental Immunology*. 2003, **133**(2), 208-218. ISSN 0009-9104.
- VREUGDENHIL, A. C.; WOLTERS, V. M.; ADRIAANSE, M. P.; VAN DEN NEUCKER, A. M.; VAN BIJNEN, A. A.; HOUWEN, R. a W. A. BUURMAN. Additional value of serum I-FABP levels for evaluating celiac disease activity in children. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2011, **46**(12), 1435-1441. ISSN 0036-5521. DOI: 10.3109/00365521.2011.627447.
- VRIEZE, A.; VAN NOOD, E.; HOLLEMAN, F.; SALOJARVI, J.; KOOTTE, R. S.; BARTELSMAN, J. F.; DALLINGA-THIE, G. M.; ACKERMANS, M. T.; SERLIE, M. J.; OOZEER, R.; DERRIEN, M.; DRUESNE, A.; VAN HYLCKAMA VLIET, J. E.; BLOKS, V. W.; GROEN, A. K.; HEILIG, H. G.; ZOETENDAL, E. G.; STROES, E. S.; DE VOS, W. M.; HOEKSTRA, J. B. a M. NIEUWDORP. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*. 2012, **143**(4), 913-6.e7. ISSN 0016-5085. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.06.031.
- WALKER, M. M. a J. A. MURRAY. An update in the diagnosis of coeliac disease. *Histopathology*. 2011, **59**(2), 166-179. ISSN 0309-0167. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2010.03680.x.
- WALL, R.; ROSS, R. P.; SHANAHAN, F.; O'MAHONY, L.; O'MAHONY, C.; COAKLEY, M.; HART, O.; LAWLOR, P.; QUIGLEY, E. M.; KIELY, B.; FITZGERALD, G. F. a C. STANTON. Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2009, **89**(5), 1393-1401. ISSN 0002-9165. DOI: 10.3945/ajcn.2008.27023.
- WANG, W.; UZZAU, S.; GOLDBLUM, S. E. a A. FASANO. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *Journal of Cell Science*. 2000, **113**(Pt 24), 4435-4440. ISSN 0021-9533.
- WANG, X.; JIA, S.; GEOFFREY, R.; ALEMZADEH, R.; GHOSH, S. a M. J. HESSNER. Identification of a molecular signature in human type 1 diabetes mellitus using serum and functional genomics. *Journal of Immunology*. 2008, **180**(3), 1929-1937. ISSN 0022-1767
- WATSON, A. J. a D. M. PRITCHARD. Lessons from genetically engineered animal models. VII. Apoptosis in intestinal epithelium: lessons from transgenic and knockout mice. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2000, **278**(1), G1-G5. ISSN 0193-1857.
- WATTS, T.; BERTI, I.; SAPONE, A.; GERARDUZZI, T.; NOT, T.; ZIELKE R. a A. FASANO. 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*. 2005, **102**(8), 2916-2921. ISSN 0027-8424.
- WEN, L.; LEY, R. E.; VOLCHKOV, P. Y.; STRANGES, P. B.; AVANESYAN, L.; STONEBRAKER, A. C.; HU, C.; WONG, F. S.; SZOT, G. L.; BLUESTONE, J. A.; GORDON, J. I. a A. V. CHERVONSKY. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*. 2008, **455**(7216), 1109-1113. ISSN 0028-0836. DOI: 10.1038/nature07336.
- WEST, N. P.; PYNE, D. B.; PEAKE, J. M. a A. W. CRIPPS. Probiotics, immunity and exercise: a review. *Exercise Immunology Review*. 2009, **15**, 107-126. ISSN 1077-5552.
- WESTERHOLM-ORMIO, M.; VAARALA, O.; PIHKALA, P.; ILONEN, J. a E. SAVILAHTI. Immunologic activity in the small intestinal mucosa of pediatric patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2003, **52**(9), 2287-2295. ISSN 0012-1797.
- WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R. a H. KING. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004, **27**(5), 1047-1053. ISSN 0149-5992.
- XU, R. Pathogenesis of diabetic cerebral vascular disease complication. *World Journal of Diabetes*. 2015, **6**(1), 54-66. ISSN 1948-9358. DOI: 10.4239/wjd.v6.i1.54.
- YAN, F. a D. B. POLK. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2004, **20**(6), 565-571. ISSN 0267-1379.

- YEUNG, W. G.; RAWLINSON, W. D. a M. E. CRAIG. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ*. 2011, **342**, d35. ISSN 0959-8138. DOI: 10.1136/bmj.d35.
- YILMAZ, Y. Systematic review: caspase-cleaved fragments of cytokeratin 18 - the promises and challenges of a biomarker for chronic liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2009, **30**(11-12), 1103–1109. ISSN 0269-2813. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2009.04148.x.
- YLIPAASTO, P.; KLINGEL, K.; LINDBERG, A. M.; OTONKOSKI, T.; KANDOLF, R.; HOVI, T. a M. ROIVAINEN. Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. *Diabetologia*. 2004, **47**(2), 225–239. ISSN 0012-186X.
- YLIPAASTO, P.; KUTLU, B.; RASILAINEN, S.; RASSCHAERT, J.; SALMELA, K.; TEERJOKI, H.; KORSGREN, O.; LAHESMAA, R.; HOVI, T.; EIZIRIK, D. L.; OTONKOSKI, T. a M. ROIVAINEN. Global profiling of coxsackievirus- and cytokine-induced gene expression in human pancreatic islets. *Diabetologia*. 2005, **48**(8), 1510–1522. ISSN 0012-186X.
- ZÁKOSTELSKÁ, Z.; KVERKA, M.; KLIMEŠOVÁ, K.; ROSSMANN, P.; MRÁZEK, J.; KOPEČNÝ, J.; HORNŮVÁ M.; ŠRUTKOVÁ, D.; HUDCOVIC, T.; RIDL, J. a H. TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ. Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. *PLoS One*. 2011, **6**(11), e27961. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0027961.
- ZHAO, J.; FROKJAER, J. B.; DREWES, A. M. a N. EJSKJAER. Upper gastrointestinal sensory-motor dysfunction in diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*. 2006, **12**(18), 2846–2857. ISSN 1948-9358.
- ZHOU, J.; MARTIN, R. J.; TULLEY, R. T.; RAGGIO, A. M.; MCCUTCHEON, K. L.; SHEN, L.; DANNA, S. C.; TRIPATHY, S.; HEGSTED, M. a M. J. KEENAN. Dietary resistant starch upregulates total GLP-1 and PYY in a sustained day-long manner through fermentation in rodents. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2008, **295**(5), E1160-E1166. ISSN 0193-1849. DOI: 10.1152/ajpendo.90637.2008.
- ZIEGLER, A.; SCHMID, S.; HUBER, D.; HUMMEL, M. a E. BONIFACIO. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA*. 2003, **290**(13), 1721–1728. ISSN 0098-7484.
- ZIPRIS, D. Innate immunity and its role in type 1 diabetes. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*. 2008, **15**(4), 326–331. ISSN 1752-296X. DOI: 10.1097/MED.0b013e3283073a46.
- ZOETENDAL, E. G.; VAUGHAN, E. E. a W. M. DE VOS. A microbial world within us. *Molecular Microbiology*. 2006, **59**(6), 1639–1650. ISSN 0950-382X.

## 9. PŘÍLOHY

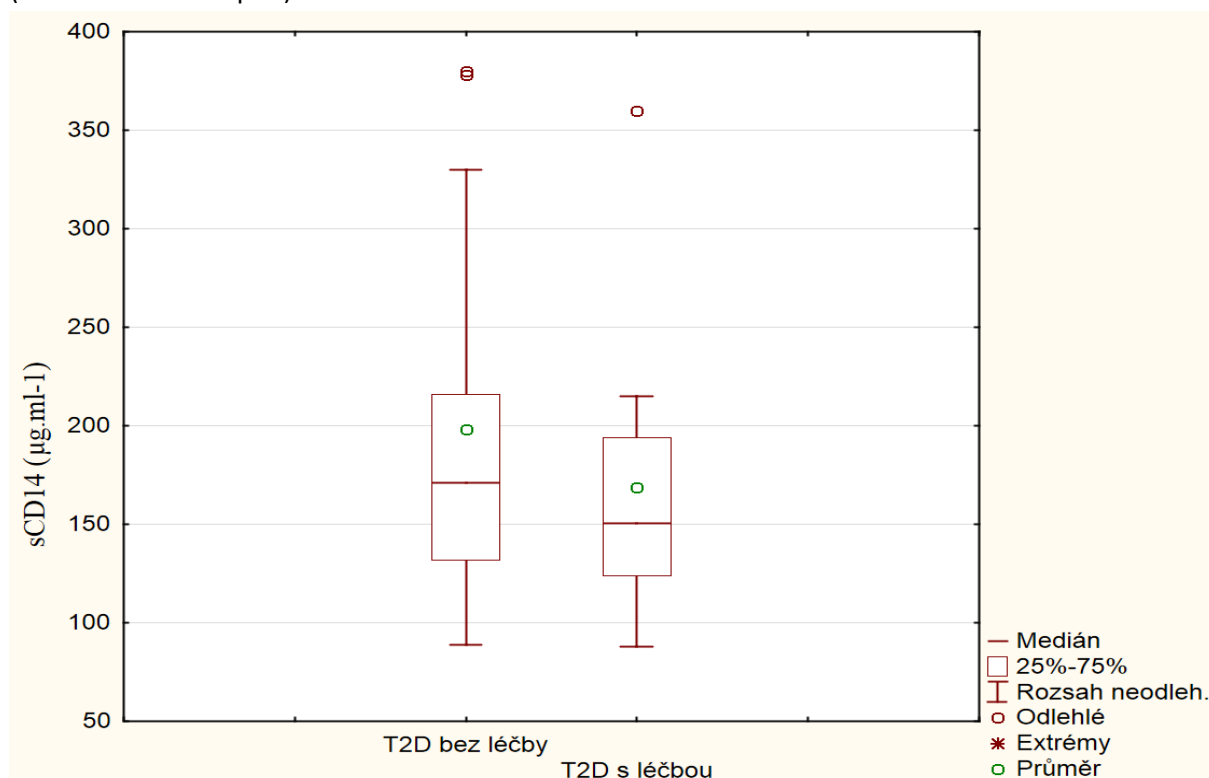
### Příloha 1. Srovnání sérových hladin markeru sCD14 u pacientů T2D bez léčby (17 pacientů) a T2D s léčbou hypolipidemiky (12 pacientů).

Jeden pacient ze skupiny T2D byl z hodnocení vyřazen, neboť u něj nebyla léčba známa.

Z níže uvedené tabulky popisných statistik a grafického znázornění v krabicovém grafu se zdá, že sérové hladiny sCD14 ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) jsou u pacientů s T2D bez léčby o málo větší než v případě T2D s léčbou hypolipidemiky.

Proměnná	Popisné statistiky (Data T2D s léčbou a bez léčby)									
	N platných	Průměr	Int. spolehl. -95,000%	Int. spolehl. 95,000%	Medián	Minimum	Maximum	Dolní kvartil	Horní kvartil	Sm.odch.
T2D bez léčby	17	198,2471	149,0271	247,4670	171,0000	89,00000	380,0000	132,0000	216,0000	95,73017
T2D s léčbou	12	168,6333	123,2939	213,9727	150,5000	88,00000	360,0000	124,0000	194,0000	71,35911

**Krabicový graf.** Dolní a horní konce čar znázorňují minimum a maximum souboru dat. Dolní okraj krabice odděluje 25 % nejnižších hodnot (dolní kvartil). Horní okraj krabice odděluje 25 % nejvyšších hodnot (horní kvartil). Čára uvnitř krabice znázorňuje medián, tedy odděluje polovinu nižších a polovinu vyšších hodnot. Kroužek uprostřed krabice znázorňuje průměr. Za extrémně odlehlou hodnotu se považuje hodnota, která je ve vzdálenosti delší než 1,5 násobek délky boxu (mezikvartilové rozpětí).



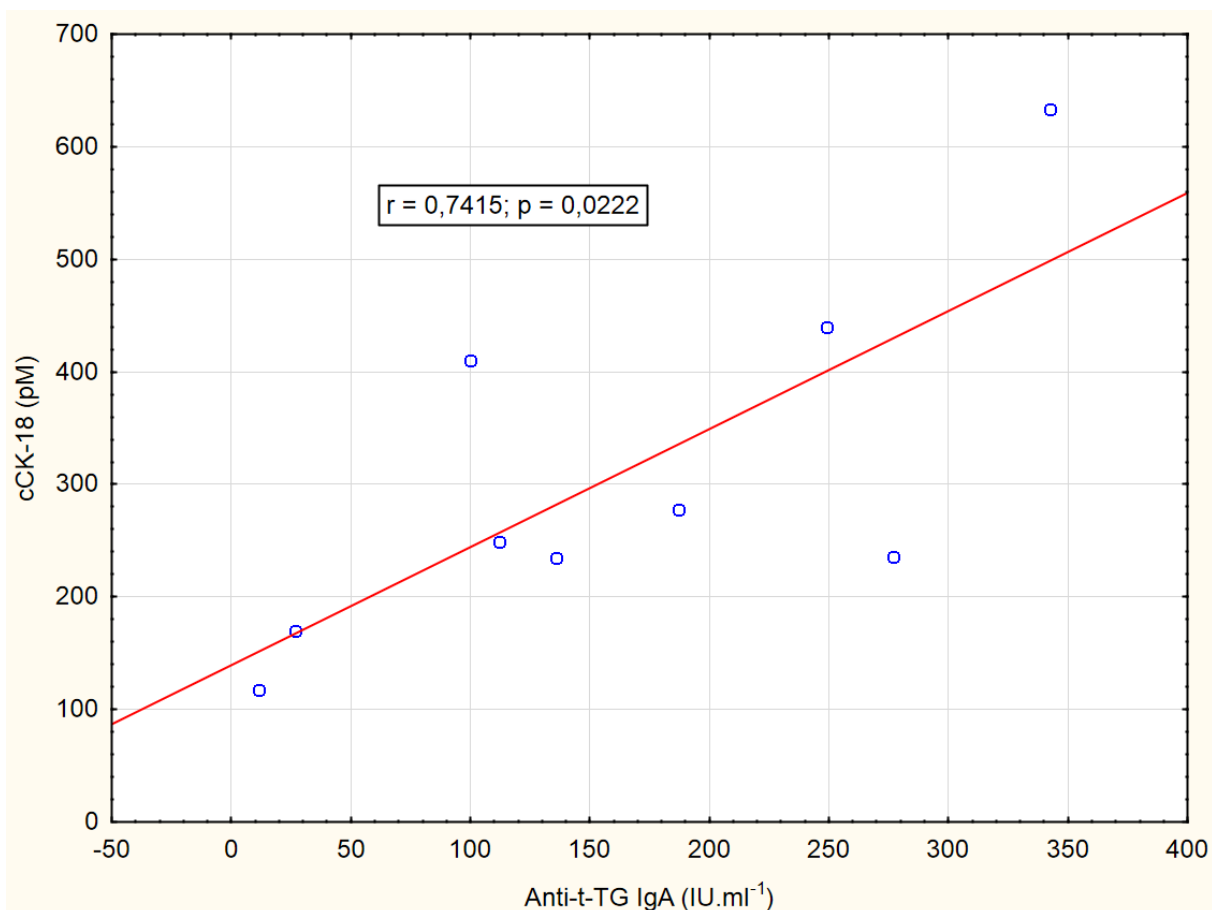
Pro srovnání obou skupin použit neparametrický **Mann-Whitneyův test**. Výsledná hodnota p byla vyšší než 0,05 ( $p = 0,438$ ). Na hladině spolehlivosti 5 % se tedy neprokázalo, že se obě skupiny statisticky významně liší.

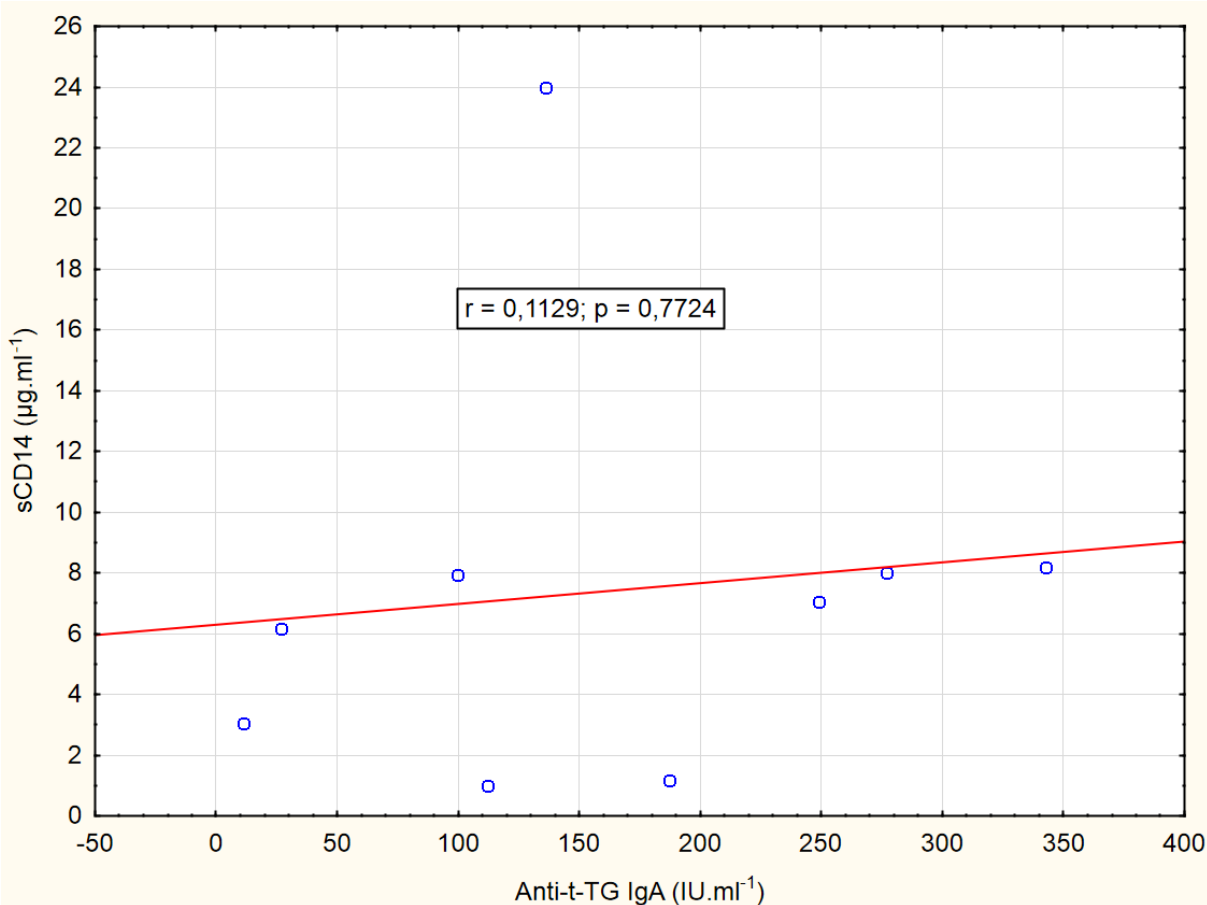
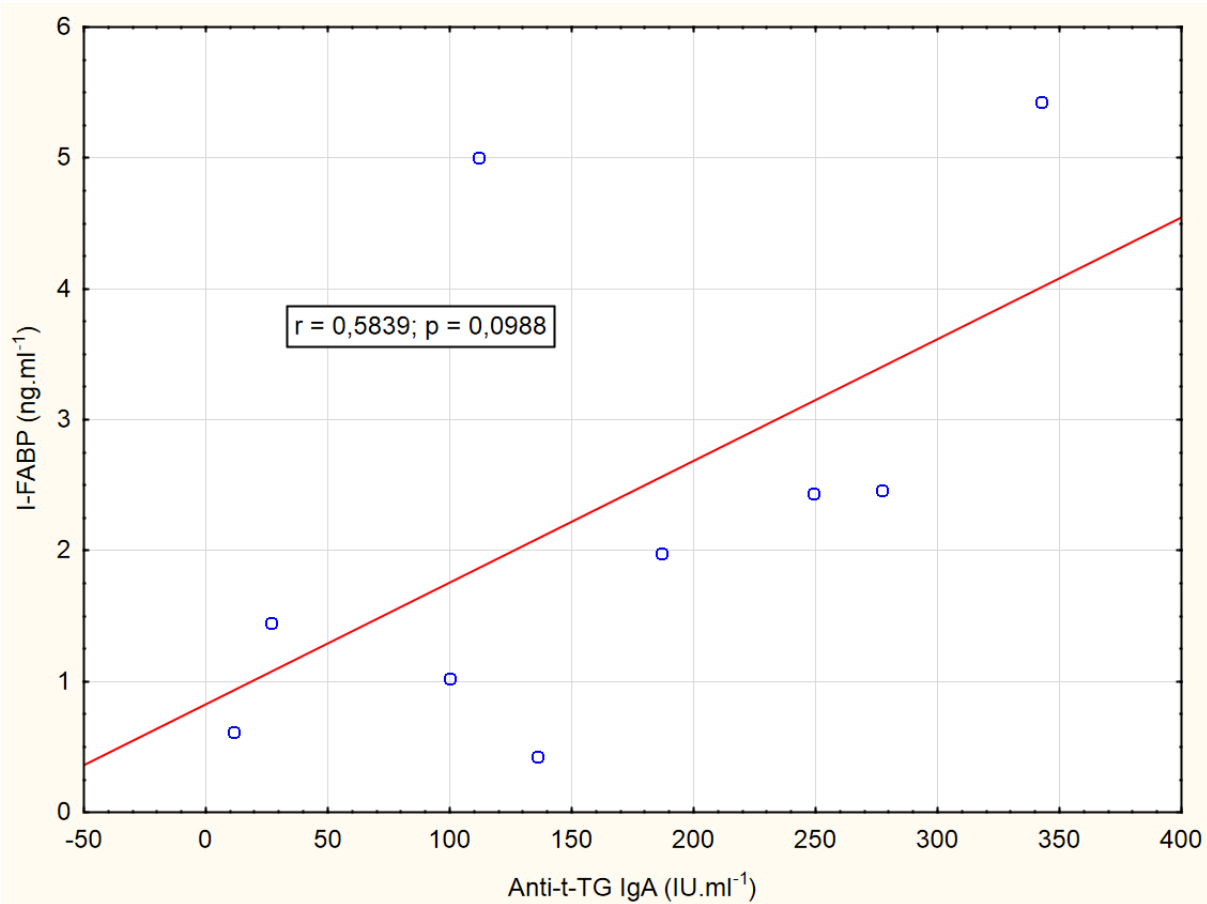
Mann-Whitneyův U Test (Data T2D s léčbou a bez léčby)							
Dle proměn. Prom4							
Označené testy jsou významné na hladině $p < ,05000$							
Proměnná	Sčet poř. T2D bez léčby	Sčet poř. T2D s léčbou	U	Z	p-hodn.	N platn. T2D bez léčby	N platn. T2D s léčbou
Prom3	273,0000	162,0000	84,00000	0,774913	0,438392	17	12

**Příloha 2. Analýza vztahu sérové hladiny anti-t-TG IgA u pacientů s recentní celiakií (CLD) k sérovým hladinám markerů cCK-18, I-FABP a CD14.**

Z níže uvedené korelační matice a příslušných bodových grafů vyplývá, že statisticky významná závislost byla zjištěna pouze mezi parametry cCK-18 a anti-t-TG IgA ( $r = 0,7415$ ,  $p = 0,022$ ).

Proměnná	Korelace (Data - Celiakie) Označ. korelace jsou významné na hlad. $p < ,05000$			
	Anti-t-TG IgA (IU.ml-1)	cCK-18 (pM)	I-FABP (ng.ml-1)	sCD14 (µg.ml-1)
Anti-t-TG IgA (IU.ml-1)	1,0000	,7415	,5839	,1129
	p= ---	p=,022	p=,099	p=,772
cCK-18 (pM)	,7415	1,0000	,5739	,0642
	p=,022	p= ---	p=,106	p=,870
I-FABP (ng.ml-1)	,5839	,5739	1,0000	-,3657
	p=,099	p=,106	p= ---	p=,333
sCD14 (µg.ml-1)	,1129	,0642	-,3657	1,0000
	p=,772	p=,870	p=,333	p= ---







## 10. SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA

### I. Publikace *in extenso*, které jsou podkladem dizertace

#### a) s IF

1. **HOFFMANOVÁ, I.**; SÁNCHEZ, D.; HÁBOVÁ, V.; ANDĚL, M.; TUČKOVÁ, L. a H. TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ. Serological markers of enterocyte damage and apoptosis in patients with celiac disease, autoimmune diabetes mellitus and diabetes mellitus type 2. *Physiological Research*. 2015, **64**(3). ISSN 0862-8408. **IF: 1.487/2013**. V tisku.
2. DRASTICH, P.; HONSOVÁ, E.; LODEREROVÁ, A.; JAREŠOVÁ, M.; PEKÁRIKOVÁ, A.; **HOFFMANOVÁ, I.**; TUČKOVÁ, L.; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H.; ŠPIČÁK, J. a D. SÁNCHEZ. Celiac disease markers in patients with liver diseases: A single center large scale screening study. *World Journal of Gastroenterology*. 2012, **18**(43), 6255-6262. ISSN 1007-9327. DOI: 10.3748/wjg.v18.i43.6255. **IF: 2.547/2012**.
3. SÁNCHEZ, D.; CHAMPIER, G.; CUVILLIER, A.; COGNÉ, M.; PEKÁRIKOVÁ, A.; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H.; **HOFFMANOVÁ, I.**; DRASTICH, P.; MOTHES, T. a L. TUČKOVÁ. Similarity of fine specificity of IgA Anti-gliadin antibodies between patients with celiac disease and humanized  $\alpha$ 1KI mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, **59**(7), 3092-3100. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf1044519. **IF: 2.823/2011**.
4. SÁNCHEZ, D.; TUČKOVÁ, L.; BURKHARD, M.; PLICKA, J.; MOTHES, T.; **HOFFMANOVÁ, I.** a H. TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ. Specificity analysis of anti-gliadin mouse monoclonal antibodies used for detection of gliadin in food for gluten-free diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, **55**(7), 2627-2632. ISSN 0021-8561. DOI: 10.1021/jf0630421. **IF: 2.532/2007**.

#### b) bez IF

1. **HOFFMANOVÁ, I.** a D. SÁNCHEZ. Neceliakální glutenová senzitivita. *Vnitřní lékařství*. 2015, **61**(3), 219-227. ISSN 0042-773X.

2. **HOFFMANOVÁ, I.**; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H.; SÁNCHEZ, D. a M. ANDĚL. Diabetes mellitus a porucha bariérové funkce tenkého střeva. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa*. 2013, **16**(3), 147-163. ISSN 1211-9326.

3. URBANOVÁ, J.; **HOFFMANOVÁ, I.** a M. ANDĚL. Manifestace diabetes mellitus 1. typu u 97leté pacientky. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa*. 2011, **14**(1), 22-24. ISSN 1211-9326.

## II. Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu dizertace

### a) s IF

1. **HOFFMANOVÁ, I.**; SÁNCHEZ, D. a V. DŽUPA. Postižení kostí a kloubů při celiakii. *Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Českoslovaca*. 2015. ISSN 0001-5415. **IF: 0.415/2013**. V tisku.

2. **HOFFMANOVÁ, I.**; ANDĚL, M. a P. KRAML. Renal risk associated with sodium phosphate medication: safe in healthy individuals, potentially dangerous in others. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2015. ISSN 1474-0338. **IF 2,735/2013**. V tisku.

3. PEKÁRIKOVÁ, A.; SÁNCHEZ, D.; PALOVÁ-JELÍNKOVÁ, L.; ŠIMŠOVÁ, M.; BENEŠ, Z.; **HOFFMANOVÁ, I.**; DRASTICH, P.; JANATKOVÁ, I.; MOTHEŠ, T.; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H. a L. TUČKOVÁ. Calreticulin is a B cell molecular target in some gastrointestinal malignancies. *Clinical and Experimental Immunology*. 2010, **160**(2), 215-222. ISSN 0009-9104. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2009.04085.x. **IF: 3.134/2010**.

### b) bez IF

1. **HOFFMANOVÁ, I.** a M. ANDĚL. Osteoporóza a metabolické kostní změny u celiakie. *Vnitřní lékařství*. 2014, **60**(7-8), 601-606. ISSN 0042-773X.

2. **HOFFMANOVÁ, I.** a M. ANDĚL. Závažná rizika spojená s užíváním natrium-fosfátových projímadel. *Vnitřní lékařství*. 2013, **59**(12), 1111-1116. ISSN 0042-773X.

3. **HOFFMANOVÁ, I.**; HAVRDA, M.; JANOTOVÁ, D.; ŠRÁMEK, D. a M. KMENT. Akutní fosfátová nefropatie jako komplikace očisty střeva ke koloskopii. *Medicína pro praxi*. 2011, **8**(12), 548-551. ISSN 1214-8687.
4. **HOFFMANOVÁ, I.**; JANOTOVÁ, D.; HAVRDA, M.; ŠRÁMEK, D. a M. KMENT. Akutní fosfátová nefropatie po přípravě k vyšetření tlustého střeva natrium-fosfátovým projímadlem. *Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie*. 2008, **62**(5), 264-269. ISSN 1213-323X.
5. MÁLKOVÁ, J.; **HOFFMANOVÁ, I.**; KNOT, J. a J. VOTAVA. Neobvyklá komplikace po aortokoronárním bypassu: akutní cholestatická hepatitida a agranulocytoza indukovaná tiklopidinem a simvastatinem u pacienta s alergií na salicyláty. *Vnitřní lékařství*. 2005, **51**(11), 1303-1305. ISSN 0042-773X.
6. **HOFFMANOVÁ, I.** Současný stav bezlepkové diety a bezlepkových potravin. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa*. 2004, **7**(4), 217-218. ISSN 1211-9326.