

Universita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni

Dětská klinika Fakultní nemocnice v Plzni

MUDr. Michal Huml

Dizertační práce:

**Vliv Gastrointestinálního traktu na kompenzaci
diabetes mellitus typu 1 v dětském věku**

Gastrointestinální hormony

2010



Poděkování za laskavost a cenné připomínky patří

Doc. MUDr. J. Sýkorovi, Ph.D.

Doc. MUDr. J. Varvařovské, Ph.D.

MUDr. R. Pomahačové, Ph.D.

Ing. MUDr. K. Sialovi, Ph.D.

Ing. MUDr. T. Votavovi

Prim. MUDr. Z. Černé

Doc. MUDr. J. Kobrovi, Ph.D.

Miladě Maidlové

Lucii Měříčkové

Ladislavě Hájkové

A všem lékařům a sestřičkám dětské kliniky FN Plzeň

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Diabetes mellitus typ 1	1
1.1.1	Patoimunologie T1DM.....	1
1.1.2	Epidemiologie T1DM	3
1.1.3	Hyperglykemie a T1DM	5
1.1.4	Faktory ovlivňující kompenzaci T1DM.....	5
1.1.5	Ovlivnění kompenzace T1DM gastrointestinálním traktem	6
2	Gastrointestinální hormony - charakteristika hormonů a současný stav problematiky	11
2.1	Amylin.....	11
2.2	Inkretiny.....	12
2.2.1	GLP-1	13
2.2.2	GIP	14
2.3	Ghrelin.....	15
2.4	Leptin.....	17
2.5	Pankreatický polypeptid	18
2.6	Peptid YY	19
3	Cíle práce	22
4	Materiál a metodika	24
4.1	Soubor.....	24
4.1.1	T1DM	24
4.1.2	Zdravé kontroly	25
4.1.3	FBB	25
4.2	Protokol studie.....	28
4.3	Analýza a laboratorní testy	28
4.4	Statistika	32
5	Výsledky	33
5.1	GIT hormony u T1DM jedinců	33

5.1.1	GIT hormony	33
5.1.2	Korelační analýza	40
5.2	GIT hormony u skupiny jedinců dle hladiny glykovaného hemoglobinu	45
5.2.1	GIT hormony	45
5.2.2	Korelační analýza	54
5.2.2.2	Korelace	54
5.3	GIT hormony a FBB	56
5.3.1	GIT hormony	56
6	Diskuze	62
6.1	Amylin	62
6.2	Inkretiny	64
6.2.1	GIP	64
6.2.2	GLP-1	65
6.3	Ghrelin	66
6.4	Leptin	68
6.5	Pankreatický polypeptid	69
6.6	PYY	70
6.7	Funkční bolesti břicha a GIT hormony	71
7	Závěry	73
8	Souhrn	75
9	Summary	77
10	Literatura	79
11	Publikační činnost	96

Seznam zkratek:

APC – antigen prezentující buňky

BMI - body mass index

ČR - Česká republika

DR3/DR4 – hlavní komplex histokompatibility, 2. třída, DR3 a DR 4

FBB – funkční bolesti břicha

FD - funkční dyspepsie

GAD65 – dekarboxyláza kyseliny glutamové

GIP - gastric inhibitory polypeptide, nověji glucose-dependent insulinotropic peptide

GIT – gastrointestinální trakt

GLP-1 - glucagon-like peptide 1

H. pylori - *Helicobacter pylori*

HbA_{1c}- glykovaný hemoglobin A_{1c}

IA-2 – protilátky proti tyrozin fosfatáze

IAA – protilátky protiinzulínu

ICA512 – protilátky proti proteinu sekrečních granul β -buněk

IL - interleukin

ISPAD – mezinárodní společnost pro dětský a juvenilní diabetes

PMT 563-587nm – fotonásobič 563-587nm

PP - pankreatický polypeptid

PYY - peptid YY

RAP – recidivující bolesti břicha

T1DM - diabetes mellitus typ 1

TNF- α - tumor necrosis factor alfa

xMAP Luminex – multiplexová metoda Luminex

YAG-laser - Yttrium Argon Germanium laser

Gastrointestinální hormony a diabetes mellitus typu 1 v dětském věku

1 Úvod

1.1 Diabetes mellitus typ 1

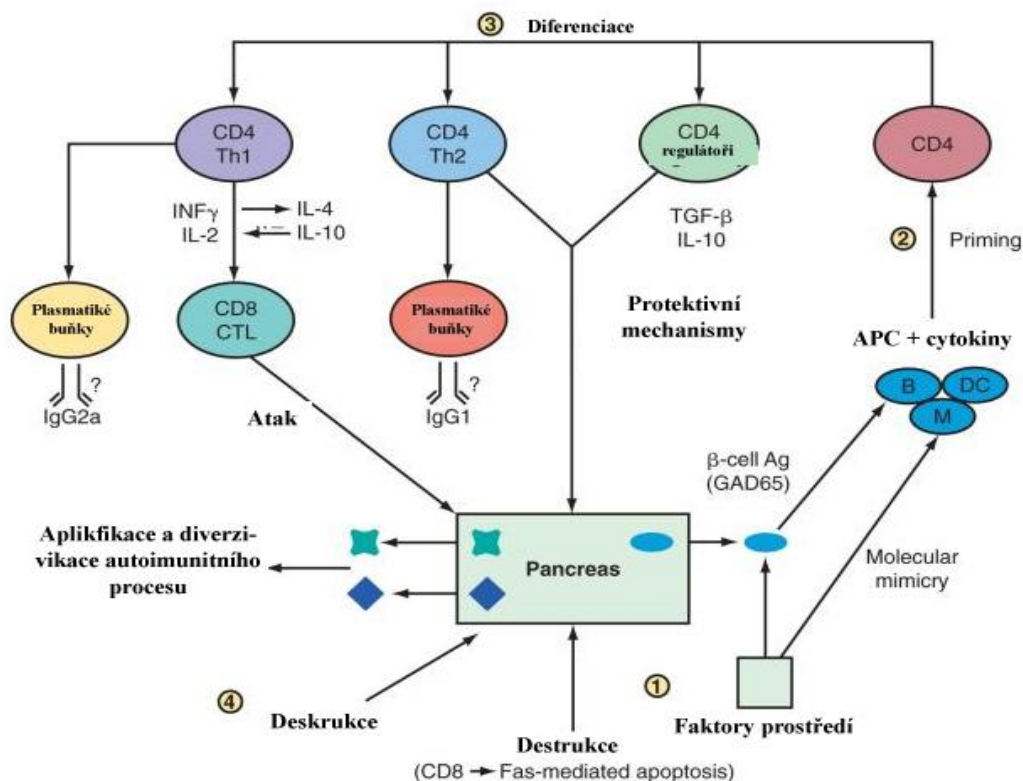
T1DM je chronické autoimunitní onemocnění spojené s poruchou metabolických pochodů jedince, které vzniká v důsledku autoimunitní destrukce β -buněk Langerhanzových ostrůvků pankreatu.

1.1.1 Patoimunologie T1DM

Příčina vzniku autoimunitní destrukce β -buněk je multifaktoriální. Rizikovým faktorem je genetická výbava jedince spojená s hlavním komplexem histokompatibility II. třídy, u něhož dojde v důsledku vnější noxy k spuštění autoimunitní kaskády. Tato kaskáda nebyla prozatím identifikována. U jedinců nesoucí genotyp DR3 nebo DR4 je relativní risk vzniku T1DM větší než u běžné populace (1). Inzult zprostředkovaný T-lymfocyty vede k uvolnění antigenů β -buněk (GAD65). Tyto antigeny jsou APC prezentovány CD4 T-lymfocytům. CD4 T-lymfocyty podporují diferenciaci T-lymfocytu na Th1-helpers. Makrofágy secernují IL-12 a stimulují CD4 T-lymfocyty k produkci interferonu γ a IL-2 (2; 3). Interferon γ stimuluje další makrofágy, které produkují cytokiny IL-1 β , TNF- α a volné radikály NO₂ \cdot , O₂ \cdot , jež působí dále cytotoxicky na β -buňky pankreatu (2). Převaha Th1 buněk vede k diferenciaci k autoantigen cytotoxických CD8 T-lymfocytů, které uvolněním perforinu, granzymu a Fas aktivovanou apoptózou destruuji β -buňky Langerhanzových ostrůvků pankreatu a dále uvolňují další antigeny (4).

Autoimunitní odpověď je po určitou dobu udržována a dále diverzifikována proti více epitopům, tím dojde k dysfunkci protektivních imunitních mechanismů jedince (**Schéma 1**). Příznaky onemocnění se projeví při destrukci asi 80-90% buněk (5). Rychlost destrukce je různá. U mladších jedinců především s haplotypy DR3/DR4 proběhne destrukce buněk během úvodních 1-3 let od propuknutí nemoci, kdežto u starších jedinců dochází ke kompletní destrukci i po 10 letech trvání nemoci. U většiny T1DM pacientů při propuknutí onemocnění je detekováno více druhů protilátek GAD65, ICA512/IA-2 a IAA (**Schéma 2**) (6). Průběh onemocnění můžeme rozdělit do 4 stádií: (1) preklinické stadium (destrukce β -buněk pankreatu), (2) postupné propuknutí onemocnění, (3) přechodná remise „honeymoon period“, (4) vlastní onemocnění.

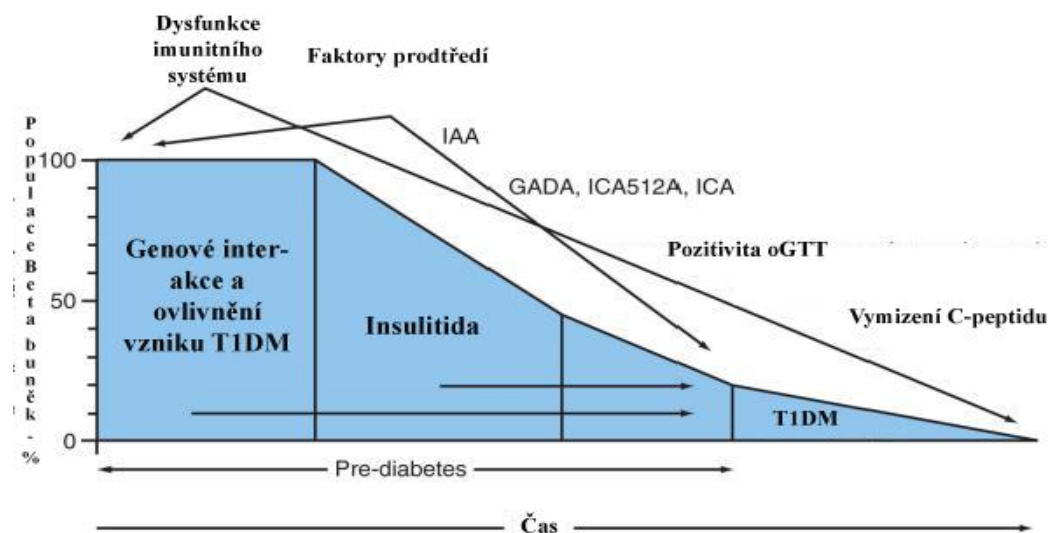
Schéma 1
Autoimunitní odpověď proti β -buňkám pankreatu



Zdroj: Casares S, Brumeanu TD: Insights into the pathogenesis of T1DM: A hint for novel immunospecific therapies. *Curr Molec Med* 2001;1:357–378 a upraveno dle Huml M. et al.

Schéma 2

Časový vývoj destrukce β -buněk



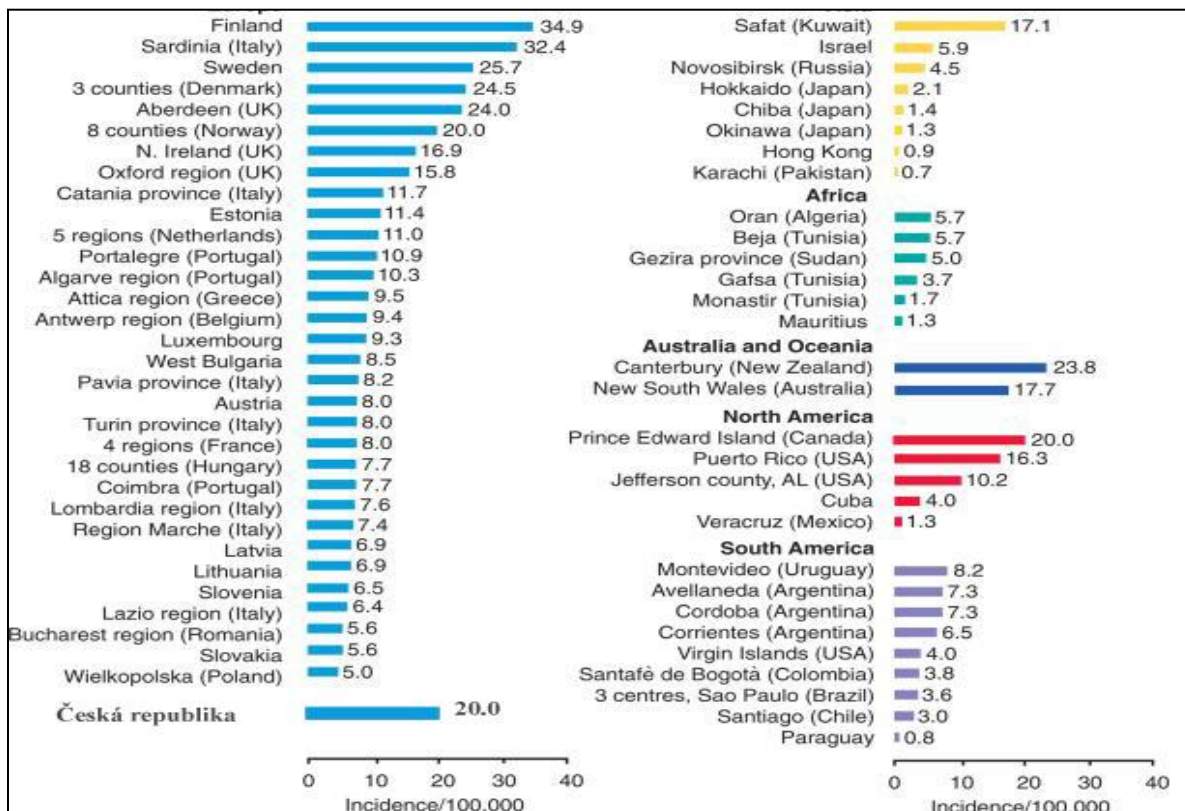
Zdroj: Atkinson MA, Eisenbarth GS: Type 1 diabetes: New perspectives on disease pathogenesis and treatment. Lancet 2001;358: 221–229 a upraveno dle Huml M. et al.

1.1.2 Epidemiologie T1DM

T1DM je nejčastější typ diabetes mellitus vyskytující se v dětském věku s velmi závažnými důsledky pro jedince. Incidence onemocnění v ČR pohybuje na hranici 20 případů na 100tis. obyvatel (7). V poslední dekádě dochází k významnému nárůstu incidence T1DM ve vyspělých státech Evropy a světa (**Tabulka 1**) v celém spektru věkových skupin dětských pacientů. Nejprogresivněji je tomu u dětí nejmladších věkových skupin, tj. v předškolním věku (**Tabulka 2**).

Tabulka č. 1

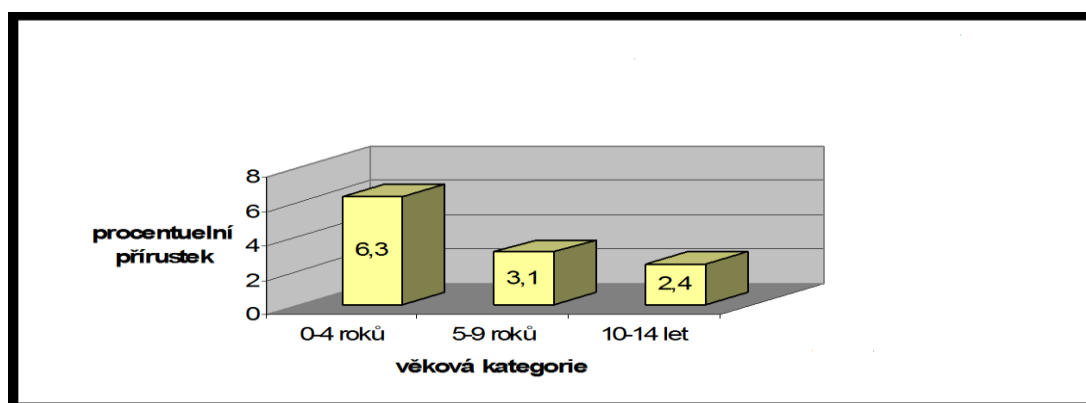
Incidence T1DM ve státech jednotlivých světadílů na 100 tis. obyvatel



Zdroj: Nelson Textbook of Pediatrics, Elsevier, 18th ed., 2008 a upraveno dle Huml M. et al.

Tabulka č. 2

Procentuální meziroční růst incidence T1DM v různých věkových kategoriích



Zdroj: Nelson Textbook of Pediatrics, Elsevier, 18th ed., 2008 a upraveno dle Huml M. et al.

1.1.3 Hyperglykemie a T1DM

Porucha metabolické rovnováhy T1DM vede k recidivujícím hyperglykemiím. Naše pracovní skupina prokázala, že hyperglykemie u T1DM v dětském věku je spojena se zvýšeným oxidačním stresem (8). Hyperglykemie indukuje nadprodukcí superoxidu. Zvýšená tvorba kyslíkových radikálů poškozuje buněčné proteiny, lipidy membrán, nukleové kyseliny vedoucí k buněčné smrti a rozvoji degenerativních změn. I přes intenzivní terapii se u mnohých T1DM pacientů nedaří dosáhnout dobré kompenzace T1DM, což přispívá k rozvoji komplikací T1DM. Juvenilní diabetes a s ním spojené komplikace se podílejí na zkrácení průměrné délky života nemocných až o 15 let (9).

1.1.4 Faktory ovlivňující kompenzaci T1DM

Glykemie vzhledem k centrálnímu postavení je pod vlivem řady různých faktorů. Uplatňují se základní prvky léčby T1DM (inzulinoterapie, dodržování diety, fyzická aktivita, edukace a self-monitoring), přítomnost komplikací T1DM (makro- i mikroangiopatie – diabetická neuropatie, nefropatie, retinopatie), dále přidružené autoimunitní onemocnění (především autoimunitní thyroditis, celiakální sprue), infekční nemoci (horních cest dýchací, gastrointestinální infekce), stav pacientovi psychiky, rodinné zázemí a v neposlední řadě diabetologický tým starající se o pacienta. Kvalita metabolické kompenzace je úzce spjata s prognózou onemocnění a přímo úměrná riziku rozvoje komplikací (10).

1.1.5 Ovlivnění kompenzace T1DM gastrointestinálním traktem

Gastrointestinální onemocnění se běžně vyskytují v normální populaci, ale také u jedinců s T1DM. Snaha najít ekvilibrium mezi dávkou inzulínu a požadovanou energií organismem staví GIT jako vstupní bod do důležité role. K postižení GIT může dojít na základě anatomického členění od dutiny ústní až po perianální oblasti, dále GIT může být postižen v důsledku různých patofyziologických mechanismů. Kompenzaci T1DM může ovlivňovat sdružené autoimunitní onemocnění (1) celiakální sprue, (2) chronická infekce (*H. pylori*), (3) porucha autonomního nervového systému (gastroparéza), (4) lokálně produkované peptidy (gastrointestinální peptidy). Dysfunkce v oblasti GIT může vést ke zhoršené metabolické kontrole onemocnění.

1.1.5.1 Přidružené autoimunitní onemocnění a T1DM

T1DM je autoimunitní onemocnění (11), které bývá sdruženo i s dalšími onemocněními, např. juvenilní lymfocytární thyroditis, autoimunitní adrenalitidou vedoucí k Addisonově chorobě, atrofickou gastritidou a také celiakií (celiakální sprue, glutenová enteropatie) (12; 13). U T1DM pacientů se vyskytuje celiakie s prevalencí asi 4-6%, u většiny z nich probíhá asymptomaticky nebo si příznaků nejsou vědomi, tj. asi desetinásobek ve srovnání s předpokládanou prevalencí v běžné dětské populaci (14; 15; 16). Až u 1/3 pacientů se objeví jinak nevyšetřitelné příznaky onemocnění - neprospívání na váze, průjmovitých stolic, porucha růstu, bolesti břicha nebo anémie (17). Pod vlivem autoimunitního zánětu dochází k atrofii klků tenkého střeva a poruše absorpce živin až vzniku malabsorpčního syndromu. Je otázkou, zda zánětem poškozená sliznice ovlivňuje metabolickou kontrolu a potřebu inzulínu u T1DM pacientů? Mohn a spol. popsali vyšší výskyt ranních hypoglykemických epizod u T1DM dětí

s celiakální sprue především krátce po zavedení bezlepkové diety (18). Avšak po stabilizaci a dodržování bezlepkové diety se počet prodělaných hypoglykemií nelišil od běžné T1DM populace. Poškození střevní sliznice při celiakální sprue pravděpodobně zvyšuje riziko hypoglykemie u T1DM dětí. Acertini a spol. nenalezli žádné statisticky významné rozdíly v metabolické kontrole a potřebě inzulínu mezi dětskými T1DM a zdravými jedinci (19). Ke stejným závěrům dospěl i kolektiv Kaukinena a jeho spolupracovníků (20).

1.1.5.2 Infekce a T1DM

Infekce u T1DM jedinců zhoršuje metabolickou kompenzaci a zvyšuje potřebu inzulínu (21). Infekce vede u T1DM k hyperglykémii v důsledku sekrece kontra-regulačních hormonů (katecholaminů, glukagon, kortikosteroidů, hormonů štítné žlázy) a produkce cytokinů (IL-1, IL-6, TNF- α). Samotné cytokiny zpětně stimulují sekreci kontra-regulačních hormonů a přímo ovlivňují metabolismus glukózy (21). Byly popsány elevované klidové hladiny cytokinů (IL-1, IL-6, TNF- α) u T1DM ve srovnání se zdravou populací (22).

Helicobacter pylori (*H. pylori*) je původce nejběžnější chronické bakteriální infekce světa, převážně získanou v dětství, a která je spojena s produkcí zánětlivých cytokinů (TNF- α , interleukinu 1,6). HP je považován za hlavního gastroduodenálního patogena ve spojitosti s žaludečními a duodenálními vředy, žaludečními malignitami, bolestmi břicha, non-ulcerózní dyspepsií a s poruchou motility žaludku (23). HP infekce je dávana do souvislosti s propuknutím některých autoimunitních onemocnění (24). T1DM v důsledku hyperglykemií je spojen s vyšší vnímavostí k infekcím (25). U T1DM pacientů byla popsána dysbalance imunitního systému a to abnormality leukocytů (neutrofilů, monocytů a lymfocytů) ve spojitosti s chemotaxí, fagocytózou, oxidativním vzplanutím. Gallacher popsal negativní korelaci mezi glykovaným hemoglobinem (HbA_{1c}%) a schopností neutrofilů ničit bakterie (26).

Předpokládalo se, že prevalence HP infekce bude vyšší mezi T1DM a povede k zhoršení metabolické kontroly základního onemocnění. Mimo ojedinělé studie, které prokázala zlepšení HbA_{1c}% u dětských T1DM po eradikaci HP a jejíž výsledky jsou zatíženy malým počtem probandů (n=13) (27), další studie neprokázaly vliv HP infekce na T1DM a nebylo prokázáno zlepšení HbA_{1c}%, v denní potřebě inzulínu a ani v úspěšnosti eradikaci HP u T1DM jedinců. Na rozdíl od dospělé populace, u které byla popsána nižší úspěšnost eradikace HP infekce u T1DM (28; 29). Naše skupina také neprokázala vliv HP infekce na kompenzaci T1DM, ale HP pozitivní status byl signifikantně spojen s příznaky horního dyspeptického syndromu (30; 31). Je možné spekulovat, že k ovlivnění kontroly T1DM dochází až při déle trvající infekci HP a tedy z eradikace onemocnění více profitují dospělí T1DM jedinci (28).

1.1.5.3 Porucha autonomního nervového systému a T1DM

Neuropatie je považována za hlavní komplikaci T1DM u dospělých jedinců (32). Významně přispívá k celkové morbiditě a mortalitě onemocnění. Termín diabetické neuropatie je především spojován s polyneuropatií zahrnující autonomní i periferní nervový systém. Dle dat z rozsáhlých epidemiologických studií polyneuropatie se vyskytuje až u 66% T1DM dospělých jedinců (33). Neuropatie autonomního nervového systému byla potvrzena i u dětských T1DM pacientů (32). Příznaky neuropatie sensoricko-motorických vláken předchází rozvoji poruchy autonomního systému, výjimečně v opačném sledu. Pod vlivem autonomní neuropatie, fluktuace glykemie dochází k poruše koordinace motorického komplexu žaludku – tzv. diabetické gastroparéze (34; 35; 36). Změna rychlosti evakuace žaludku mimo subjektivních symptomů nadýmání, pocitů plnosti vede ke vzniku neočekávaných hypoglykemií a následným hyperglykemiím (37). Hyperglykemie dále přispívají k zvýšené tvorbě kyslíkových radikálům, jenž nadále poškozují nervová vlákna a tím uzavírá pomyslný „circulus viciosus“. Až 44% pacien-

tů umírá v průměru do 2.5 roků od diagnózy symptomatické autonomní neuropatie. Reid a spol. popsal kazuistiku 3 adolescentů, u nichž byla scintigraficky prokázána gastroparéza a následná léčba prokinetiky vedla k zlepšením metabolické kontroly (38). Také White a spol. popisují kazuistiky 2 mladých jedinců s gastroparézou, u kterých došlo k zlepšení metabolické kontroly po zahájení léčby (39). Cucchiara s spol. popsal prodlouženou dobu evakuace a elektrické abnormality žaludku u T1DM dětských pacientů spojené s vyšší hladinou HbA_{1c}% a horšími postprandiálními glykemickými profily (40). Dětské T1DM s jinak nevysvětlitelnou špatnou kompenzací onemocnění by měli být vyšetřeny stran poruchy motility žaludku.

1.1.5.4 Gastrointestinální hormony a T1DM

Moderní strategie léčby T1DM se opírá o substituci inzulínu. Od roku 1921, kdy byl tento hormon objeven, je jediným lékem volby pro T1DM pacienty. Díky intenzifikovanému inzulínovému režimu dosahují pacienti lepší metabolické kontroly onemocnění a snížení rizika rozvoje komplikací spojených s T1DM, která je však vykoupena vyššími váhovými přírůstky a současně třikrát vyšším rizikem hypoglykemie především v době adolescence (41). Substituce inzulínu i přes celou řadu inzulínových analog a inzulínových pump neodráží sekreční profil zdravých jedinců. Perzistující nebo postprandiální hyperglykemie není výjimkou v dětském věku.

I přes existenci celé řady substitučních režimů v léčbě T1DM stále dochází k substituci jediného hormonu – inzulínu, jehož sekrece je poškozena destrukcí β -buněk pankreatu. Několik posledních let je intenzivně zkoumán vliv gastrointestinálních peptidů na T1DM a jeho kompenzaci, což je předmětem této dizertační práce. Tyto působky ovlivňují motilitu GIT (amylin, GIP, GLP-1, PYY), působí na produkci glukózy játry (amylin, ghrelin, PP, GIP, GLP-1 a leptin), inzulínovou sekreci (amylin, ghrelin, GIP, GLP-1, PP) či zvyšují přežití

β -buněk Langerhanzových ostrůvků. Popis účinků jednotlivých hormonů ve vztahu k T1DM a jeho kompenzaci (**tabulka 3**). GIT hormony a hormony související s glukózovým metabolismem byly studovány na zvířecích i lidských modelech. Existuje však množství pochodů a interakcí, které nejsou zcela objasněny. Světová literatura neobsahuje dostatečné informace ve vztahu k dětskému T1DM.

2 Gastrointestinální hormony - charakteristika hormonů a současný stav problematiky

V popředí výzkumů stojí hormony produkované pankreatem (amylin, ghrelin, PP) a gastrointestinální traktem (ghrelin, GIP, GLP-1, peptid YY) nebo tukovou tkání (leptin).

2.1 Amylin

Amylin je polypeptid tvořený řetězcem 37 aminokyselin a je secernován β -buňkami Langerhansových ostrůvků společně s inzulínem. Gen amylinu byl lokalizován na chromozomu 12 (42). Amylin vzniká z preproamylinu proteolýzou proamylinu, 67-aminokyselinový řetězec, z kterého následně vzniká dalšími úpravami konečná podoba amylinu (43; 44). Molekula amylinu napodobuje strukturu vlastní molekuly inzulínu. Obsahuje disulfidické můstky a C-terminální úsek, jenž je esenciální pro jeho biologickou aktivitu (45). Rostoucí hladina glykemie po požití stravy je signálem k sekreci amylinu. K tomu dochází ve β -buňkách pankreatu ve společných vezikulách s inzulínem, kde je skladován v molárním poměru 1:100 ve prospěch inzulínu (46; 47). Ledvinná clearance amylinu je podobně jako C-peptidu nižší než inzulínu, proto během lačnění je poměr v oběhu amylinu k inzulínu 1:7-1:16 (48; 49). Závěry studií účinků amylinu u T1DM jedinců jsou odlišné od závěrů studií na zvířecích modelech. Především popírají souvislost amylinu s inzulínovou senzitivitou, která byla popsána na zvířecích modelech (50). Další dvě důležité vlastnosti amylinu jsou popsány i u lidských T1DM jedinců - zpomalení evakuace žaludku a inhibice sekrece glukagonu, tento účinek je důležitější než ovlivnění inzulínové sekrece a senzitivity (51; 52). Rychlost evakuace žaludku je na dávce závislá amylinu. Hypoglykémie působí nadřazeně na účinek amylinu a evakuaci žaludku (53). Inhibice sekrece glukagonu je také na dávce závislá a k supresi dochází již při velmi

malých dávkách amylinu. Amylin také ovlivňuje pocit sytosti. Receptory amylinu byly identifikovány v jádrech hypotalamu řídící pocit sytosti (lamina terminalis a area postrema). Data recentních studií naznačují, že amylin má centrální anorektický efekt (54; 55). U T1DM byly nalezeny nízké hladiny amylinu na rozdílné stimuly bez ohledu na perorální nebo intravenózní podání. Důsledkem snížených hladin amylinu u T1DM dospělých jedinců dochází ke ztrátě důležitých postprandiálních účinků. Jedná se především supresivní účinek na sekreci glukagonu a zpomalení evakuace žaludku (51; 52), proto naším cílem je substituce účinků amylinu. Syntetický analog amylinu byl již vyvinut a schválen k léčbě dospělých T1DM jedinců v kombinaci s inzulínem. Ukazuje se, že při dlouhodobé terapii dochází k redukci počtu postprandiálních exkurzí glukózy, snížení hladiny HbA_{1c}% a váhy pacientů bez současné potřeby navýšení dávky inzulínu (56; 57; 58). Potvrzením nízkých hladin amylinu i u dětských T1DM pacientů by se otevřel nový prostor pro jejich léčbu.

2.2 Inkretiny

Téměř před 100 lety Moore a spol. popsali substanci v duodenálním extraktu, jenž měla hypoglykemizující vlastnosti (59). Látky začaly být později označovány jako inkretiny. Inkretiny jsou hormony secernované trávicím traktem a mezi zástupce se řadí GIP a GLP-1. Polypeptidy, které jsou uvolňovány po požití stravy do oběhu, modulují sekreci, účinky inzulínu a další metabolické pochody (**tabulka 3**). Sekreční odpověď inzulínu na působení inkretinů se nazývá „inkretin efekt“ (60). Přibližně 50% část secernovaného inzulínu po požití stravy obsahující glukózu je uvolněno v důsledku účinku inkretinů. Vzhledem k této vlastnosti jsou inkretiny označovány jako inzulinotropické hormony (61).

2.2.1 GLP-1

GLP-1 je secernován postprandiálně L-buňkami rozmístěnými v průběhu celého tenkého střeva a vzestupného tračníku (62). GLP-1 vzniká po translační úpravou působením konvertázy PC/1 produktu genu pro proglukagon umístěný na chromozomu 2 (63). Proglukagon je gen kódující dva glucagon-like peptidy (GLP-1 a GLP-2), které sdílejí asi 50% strukturální homologie s glukagonem. GLP-2 nemá žádné inzulotropické ani hypoglykemizující účinky. U lidských jedinců existuje GLP-1 v několika podobách, až 80% GLP-1 je tvořena biologicky aktivní formou látky GLP-1(7-36) amid, méně pak zastoupena GLP-1 (7-37). GLP-1 dosahuje svého účinku navázáním na specifické receptory – (GLP-1R) (60), zvyšující intracelulárních posílů cAMP a Ca^{2+} . Kromě insulintropického efektu GLP-1 inhibuje žaludeční evakuaci a inhibuje sekreci glukagonu, dále chrání β -buňky před apoptózou a stimuje proliferaci ductálních buněk a diferenciaci nezralých progenitorů pankretických ductu v buňky podobné β -buňkám Langerhazových ostrůvků (38). Biologický poločas GLP-1 je velmi krátký v řádu několika minut vzhledem k enzymatické degradaci dipetidyl-peptidázou-IV (DPP-IV) a rychlé ledvinné clearance (64; 65). Hladina GLP-1 prudce stoupá během několika minut po požití stravy, k návratu k bazálním hladinám dochází během 2–3 hodin (60). Absence genů pro GLP-1 vede k rozvoji diabetu mellitu. Vztah byl prokázán pomocí geneticky modifikovaných knock-out myši. Účinky GLP-1 na cílové tkáně jsou shrnuty v **tabulce 3**. U T1DM pacientů byl popsán nízký „inkretin efekt“, avšak hladiny jednotlivých inkretinů se statisticky nelišily v porovnání se zdravou populací (66; 67). Aplikací exogenního GLP-1 dochází k prodloužení času evakuace žaludku. Dle výsledků Myhreo a Willmse se čas prodlužuje až na dvojnásobnou hodnotu (68; 69). Výsledky randomizovaných dvojité zaslepených studií ukazují signifikantní zlepšení glykemie nalačno u T1DM jedinců, kterým byla podána infuze s GLP-1 (70). Další studie hodnotící postprandiální hyperglykemické exkurze u T1DM prokázaly, že podáním infuze s GLP-1/inzulín mají pacienti zlepšené glykemické profily

v porovnání s aplikacemi samotného inzulínu (71; 72). Tyto závěry podporují hypotézu zvýšené senzitivity inzulínu indukované účinkem GLP-1 a inhibice abnormální sekrece glukagonu. Poznáním účinků GLP-1 na glukózový metabolismus rozpoutalo vlnu zájmu o tento polypeptid. Informace ve světové literatuře hodnotící hladiny a účinky GLP-1 na dětské T1DM populaci jsou prozatím nedostatečné.

2.2.2 GIP

K syntéze GIP dochází v K-buňkách v oblasti duodena a jejunu. Jedná se o peptid tvořený 42 aminokyselinami vznikající postranslační modifikací 153 aminokyselinového polypeptidu, který je kódován GIP genem na chromozomu 17 (73). GIP byl nejprve spojován s inhibicí sekrece žaludeční kyseliny a motility GIT v suprafyziologických hladinách. Pozdější studie prokázaly jeho stimulační účinek na sekreci inzulínu. Obdobně jako GLP-1 i GIP cirkuluje nalačno v nízkých hladinách. K jeho syntéze a uvolnění do oběhu dochází po požití stravy obsahující glukózu a lipidy (74; 75; 76). Požitím samotných lipidů bez přítomnosti sacharidů nedojde k dostatečné sekreci GIP, která by stimulovala sekreci inzulínu. Sekrece inzulínu facilitována GIP je dependentní na glukóze (77). GIP se váže na specifické receptory (GIRP), jejichž aktivací se zvýší intracelulární hladiny cAMP a Ca^{2+} . GIP kromě inzulínotropního účinku také společně s inzulínem stimuluje inkorporaci mastných kyselin do triacylglyceridů v adipocytech, zvyšuje aktivitu lipoproteinové lipázy, a tím moduluje syntézu mastných kyselin. Proliferace β -buněk a délka jejich přežití je také pod vlivem GIP. Hladina GIP prudce stoupá během několika minut po požití stravy, k návratu k bazálním hladinám dochází během 2-3hodin (60). Biologický poločas GIP je velmi krátký a je enzymaticky degradován účinkem DPP-IV. Absence genů pro GIP vede k rozvoji diabetu mellitu. Vztah byl prokázán pomocí geneticky modifikovaných knock-out myší. Lynna a spol. prokázal spojitost mezi hypergly-

kemií a downregulací exprese GIPR (78; 79). Účinky GIP na cílové tkáně jsou shrnuty v **tabulce 3**. Předchozí studie prokázaly normální cirkulující hladiny GIP u nově diagnostikovaných mladistvých T1DM jedinců po zahájení inzulinoterapie (66; 80). Naopak Nakanome a spol. popsali zvýšené postprandiální hladiny u dospělých pacientů s T1DM a T2DM oproti zdravé populaci (81). Současné době není patofyziologie GIP u dětských T1DM jedinců definitivně ozřejmána.

2.3 Ghrelin

Ghrelin je polypeptid tvořený řetězcem z 28 aminokyselin a je kódován genem umístěným na chromozomu 3. Ghrelin-imunoreaktivní buňky jsou rozmístěny především v antru žaludku, duodenu, jejunu a tlustém střevě, dále jsou sporadicky nalézány v pankreatu, hypofýze, ledvinách a placentě (82; 83; 84). Produkce je z 80% zajištěna buňkami lokalizovanými v antru žaludku (85). Pro vlastní biologické účinky ghrelinu je nutná postranlační modifikace, kdy dojde k esterifikaci hydroxylové skupiny serinu a tím aktivaci ghrelinu. V krevním oběhu se nachází obě formy. Aktivní forma je díky esterifikaci nestabilní, proto hladiny aktivní formy jsou podstatě nižší než formy neaktivní. Existují 2 typy receptoru pro ghrelin podtyp 1a a 1b skládající se 7 hlavních transmembránových domén, k jeho aktivaci dochází cestou cAMP a proteinkinázy A (86; 87). Buňky produkující ghrelin v oblasti žaludku v těsné blízkosti terminálních vagových zakončení. Hladina ghrelinu je ve fetální období velmi nízká a zvyšuje se s věkem (88). Během lačnění je hladina ghrelinu elevována, naopak k jejímu poklesu dochází po požití stravy (89).

Účinky ghrelinu jsou velmi rozmanité. Ghrelin působí centrálně v oblasti hypofýzy, kde zvyšuje sekreci antidiuretického hormonu, somatotropinu, kortikotropin uvolňující hormonu a

prolaktinu. Ghrelin ovlivňuje energetickou bilanci organismu působením na centrum sytosti. Aplikace ghreluinu stimuluje příjem stravy u zvířecích modelů, současně zvyšuje sekreci žaludeční kyseliny a urychluje evakuaci žaludku. V případě krátkodobé nebo dlouhodobé negativní energetické bilance dochází k zvýšení cirkulujících hladin ghreluinu, naopak nízké hladiny jsou detekovány po požití stravy nebo při dlouhodobé pozitivní energetické bilanci. Na geneticky upravených zvířecích modelech, kterým byl vyřazen gen ghreluinu, prokázaly nižší hladiny glukózy po zátěžových testech a vyšší hladinu inzulínu ve srovnání s nemodifikovanými modely (90). Infuze ghreluinu vyvolá u zdravých mladých jedinců akutní inzulínové rezistence ovlivněním K^+ -kanálů β -buněk (91). Současné době nejsou známy přesné faktory regulující sekreci ghreluinu. Sun a spol. prokázali, že nízká hladina ghreluinu vede k zlepšení funkce β -buňky a také zvyšuje senzitivitu periferní tkáně k působení inzulínu (91). Dle závěrů dalších studií zvýšené hladiny ghreluinu působí na β -buňku a inhibují sekreci inzulínu (83; 94; 95). Celi a spol. popsali negativní korelaci mezi hladinou celkovou i hladinou aktivního ghreluinu a denní dávkou inzulínu (96). Holdstock a spol. popsali alterovanou sekreci ghreluinu u T1DM před zahájením léčby inzulínem. Hladina ghreluinu byla po podání testovacího pokrmu signifikantně snížena (97). Po roce trvání léčby došlo k normalizaci odpovědi, avšak hladiny přetrvávaly nižší ve srovnání se zdravou populací. Abnormální sekrece ghreluinu narušuje energetickou i metabolickou bilanci diabetických pacientů. Data o vztahu mezi dětskou T1DM populací a ghrelinem jsou nedostatečná.

2.4 Leptin

Leptin je polypeptid tvořený 148 aminokyselinami a je produkován adipocyty především bílé tukové tkáně (98). Jeho přítomnost byla však prokázána i v dalších tkáních - placentě, epitelálních buněk mléčné žlázy a dokonce i ve sliznici žaludku (99). Ke kódování dochází na chromozomu číslo 7 genem Ob (lep) (100). Biologickou aktivitu Ob proteinu zajišťuje terminálně umístěná disulfidická vazba. Leptin účinkuje navázáním na ob receptor. V současné době je popsáno 6 variant ob-receptoru. Pět izoform jsou buněčné receptory, šestá izoforma cirkuluje v plazmě. Buněčné izoformy jsou označovány jako Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd a Ob-Rf. Avšak pouze Ob-Rb izoforma (tzv. dlouhá izoforma) obsahuje intracelulární strukturu nutnou pro aktivaci JAK (janus kinase) - STAT (signal transducers and activators of transcription). JAK-STAT struktura je důležitá pro další přenos signálu z receptoru k nitrobuněčným systémům, které realizují vlastní odpověď buňky po navázání leptinu na jeho receptor. Ostatní izoformy s transmembránovou doménou (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd a Ob-Rf) jsou označovány jako tzv. krátké formy receptoru a podílejí se zejména na transportu leptinu do tkání a na udržování jeho setrvalé hladiny v organismu. Přítomnost receptorů byla nalezena v tkáních hypotalamu, Langerhansových ostrůvkách, nadledvinách, příčně pruhovaných svalech, tukové tkáni, srdci, játrech, plicích (101; 102).

Působením v hypotalamu, snižuje apetit a reguluje tělesnou hmotnost (100). V období vyvážené hmotnosti jedince, kdy je příjem a výdej energie v rovnosti, hladina leptinu odráží celkové množství tělesného tuku. Ke změně hladiny leptinu dochází při negativní nebo pozitivní energetické bilanci čili hladina leptinu slouží jako senzor energetické imbalance. K změně hladiny leptinu nedochází v bezprostřední souvislosti se stravou (103). Při 24 hodinovém lačnění klesá hladina leptinu oproti bazální hladině o 30%, naopak zvýší se o 50% po 12 hodinovém masivním kalorickém přívodu. Hladina leptinu a exprese Ob genu je zvýšena u obézních

jedinců. Existuje silná pozitivní korelace mezi leptinem a BMI a celkovým tělesným tukem (104; 105; 106). Na lidských i zvířecích modelech se prokázalo, že faktory ovlivňující metabolismus glukózy jako jsou glukóza, inzulín, glukokortikoidy a cytokiny, současně hrají také roli v regulaci hladiny leptinu (106; 107). Hladiny leptinu je také ovlivněna pohlavím, ženy mají tendenci k vyšším hladinám. Sexuální dimorfismus je patrný i v období adolescence (108). In vivo inzulín významně zvyšuje tvorbu leptinu (108). Existuje hypotéza, že leptin může působit jako přirozený stimulátor syntézy inzulínu cestou PI3-kinázy (109). A naopak v prostředí buněčných kultur při suprafyziologických hladinách leptinu došlo k snížené sekreci inzulínu (110). Závěry několika studií prokázaly zvýšenou sekreci leptinu při suprafyziologických koncentracích inzulínu následující po infuzi inzulínu, což je pravděpodobně v důsledku trofického efektu inzulínu a zvětšené velikosti tukových buněk (111; 112; 113). Soliman a spol. našli zvýšené hladiny leptinu u T1DM pacientů s horší glykemickou kontrolou ($>7,5\%$ HbA_{1c}), které korelovaly s vysokými dávkami inzulínu (114). Další studie porovávající zdravou dětskou populaci s T1DM jedinci neprokázala signifikantní rozdíly mezi hladinami leptinu.

2.5 Pankreatický polypeptid

PP je tvořen 36 aminokyselinami a patří do rodiny tzv. „PP peptidů“, která také zahrnuje neuropeptid Y (NPY) a peptid YY (PYY). Gen pro PP je lokalizován na chromozomu 17 a syntéza PP je realizována specializovanými PP buňkami disperzně rozmístěnými v pankreatu včetně Langerhansových ostrůvků (115; 116). PP je odvozen od prekurzoru prepropankreatického polypeptidu a jeho biologická aktivita vzniká navázáním na receptory označované „Y“ receptory. V současné době bylo identifikováno 5 podtypů, přičemž všechny jsou spojeny GTP/G-

protein signální cestou. PP je schopen se navázat na všechny podtypy Y receptorů, avšak Y₄ je preferovaně aktivován PP a byl identifikován v oblasti GIT, pankreatu, srdce, cév, hypotalamu a hippokampu (117; 118; 119; 120; 121; 122). Po požití stravy je PP secernován do krevního oběhu a hladiny zůstávají elevovány i několik hodin (123; 124). Dle dostupné literatury PP pravděpodobně hraje roli v metabolismu jedince. Nejsou popisovány rozdílné hladiny mezi pohlavími, ale pravděpodobně existuje tendence k vyšším hladinám PP u mladších dětí v porovnání s dospělými (125). U obézních jedinců byly nalezeny nízké hladiny PP, naopak zvýšené hladiny PP se nacházejí u jedinců s mentální anorexií (126; 127; 128). Na zvířecích modelech intravenózní podávání PP vedlo k snížení příjmu potravy. U jedinců s Prader-Williho syndromu, který je charakterizován obezitou a hyperfagií, byl pozorován po intravenózních infuzích PP snížený příjem stravy (129). Kono a spol. zjistili, že aplikací PP pomocí infuze dochází k nižší potřebě inzulínu u pankreotomovaných psů (130). Podáváním PP infuzemi jedincům s chronickou pankreatitidou došlo k zlepšení jejich glykemických profilů (131). Signifikantně vyšší zastoupení PP buněk v pankreatu bylo popsáno u jedinců krátce po onemocnění diabetem mellitem (132). Zvýšené hladiny PP byly popsány u dospělých T1DM (133), což poukazuje na možnou souvislost mezi hladinou PP a účinku inzulínu. Přesný mechanismus není prozatím znám a data hodnotící dětské T1DM chybí.

2.6 Peptid YY

Peptid YY (PYY) je peptid tvořen 36 aminokyselinami a jeho hlavním producentem jsou L buňky. Ty jsou lokalizovány v oblasti terminálního ilea a celého tračníku pod nepřímým neurálním a humorálním vlivem proximální části GIT (134; 135). Postprandiálně jsou do oběhu uvolňovány 2 formy PYY (PYY₁₋₃₆ a PYY₃₋₃₆) (136). V porovnání s PP k exkurzím hladin

PYY dochází pomaleji a ne bezprostředně s požitou stravou (137). Biologická aktivita peptidu podobně jako PP je realizována navázáním na receptory označované „Y“ receptory (138). V současné době bylo identifikováno 5 podtypů, přičemž všechny jsou spojeny GTP/G-protein signální cestou. PYY je schopen se navázat na všechny podtypy Y receptorů, avšak Y_2 je preferovaně aktivován PYY (138). Ty jsou převážně lokalizovány v mozku, na nervech autonomního nervového systému, cévách (139). PYY ovlivňuje na příjem stravy. U lidských jedinců po intravenózním podání PYY dochází k snížení apetitu a příjmu stravy během 24hodin. Postprandiální elevace PYY působí na receptory Y_2 lokalizované v nukleus arcuatus a inhibují příjem stravy hypotalomo-gastrointestinální cestou (140). Cirkulující PYY působí jako potentní inhibitor motility gastrointestinálního traktu, evakuace žaludku a sekrece žaludeční kyseliny, taktéž inhibují exogenní sekreci pankreatu (141). Nízké hladiny PYY korelují s poklesem inzulínu nebo sensitivitě tkání k inzulínu. Na zvířecích modelech T1DM byl zjištěn nízký počet PYY buněk v tračníku, nikoliv však v prediabetické fázi (142). Data popisují hladiny a účinky u dětských T1DM zcela chybí.

Tabulka 3: Účinek specifických hormonů

GIT hormony	Účinek specifických GIT hormonů							
	Místo syntézy	GIT motilita	Evakuace žaludku	Produkce glukózy játry	Cirkulující hladiny hormonu Nalačno	Postprandální	Inzulínová sekrece	Přezítí populace B-buněk
Amylin	pankreas	↓	↓	↓	↓	↑	↑	-
Ghrelin	GIT	-	-	↑	↑	↓	↓	-
GLP-1	GIT	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑
GIP	GIT	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑
Inzulín	pankreas	-	-	↓	↓	↑	N/A	-
Leptin	tuková tkáň	-	-	↓	-	-	↑↓	-
Pankreatický polypeptid	pankreas	-	-	↓	↓	↑	↑	-
PYY	GIT	↓	↓	-	-	-	-	-

Legenda: ↑ - zvýšený účinek; ↓ - snížený účinek; GIT – gastrointestinální trakt; N/A – neaplikovatelné, GIT – gastrointestinální trakt
Adaptováno reference: [51; 52; 96; 100; 103; 123; 124; 130; 131]

3 Cíle práce

V současné době několik studií shrnuje role GIT hormonů u dospělých pacientů s T1DM. Kromě inzulínu se objevují i další hormony, u nichž dochází k depleci nebo k alteraci jejich sekrece v důsledku autoimunitní destrukce β -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu. Substituce některých z těchto gastrointestinálních hormonů u T1DM dospělých pacientů dochází ke zlepšení metabolické kontroly a kompenzaci. Světová literatura neobsahuje dostatečné informace zabývající se GIT hormony ve vztahu k dětskému T1DM. Studie zabývající GIT hormony z komplexního hlediska a vzájemných interakcí několika hormonů není v současnosti známá. Informace o vlivu úrovně kompenzace T1DM na hladiny GIT hormonů nejsou dle dostupné literatury dostatečné.

- 1. Stanovení GIT hormonů pomocí multiplexové analytické metody u dětské populace s T1DM a jejího posouzení pro využití v klinické praxi.**

- 2. Stanovení plazmatické hladiny jednotlivých GIT hormonů u dětských pacientů (amylin, ghrelin, GIP, GLP-1, leptin, insulin, PP, PYY).**
 - a. Stanovit plazmatické hladiny GIT hormonů u souboru dětí T1DM.
 - b. Stanovit plazmatické hladiny GIT hormonů u kontrolní skupiny zdravých jedinců.
 - c. Stanovit plazmatické hladiny GIT hormonů u FBB pacientů, kteří tvoří 2. kontrolní soubor k zhodnocení sekrece GIT hormonů u dětských T1DM.

3. Posoudit vliv GIT hormonů na kompenzaci T1DM.

- a. Studovat vliv jednotlivých hormonů na metabolickou kompenzaci dětských T1DM a korelovat hladiny těchto hormonů se základními biochemickými a antropometrickými parametry dětských T1DM.

- b. Stanovení hladin GIT hormonů u skupin T1DM stratifikovaných dle hodnot HbA_{1c} a tím posoudit vliv hormonů na kompenzaci onemocnění.

4 Materiál a metodika

4.1 Soubor

Všichni pacienti byli před zařazením do studie klinicky vyšetřeni a byly stanoveny jejich základní biochemické a antropometrické parametry. Se záměrem získat validní statistické výsledky byl před zahájením studie konzultován statistik. Probandi jednotlivých analyzovaných skupin byli vybráni na základě předem stanovených vstupních kritérií. Soubor studie tvořilo 55 dětí, ty byly rozděleny do 3 souborů (T1DM, zdravé kontroly a soubor dětí s FBB). Mezi jednotlivými skupinami nebyl statistický rozdíl ve věkovém rozložení, pohlaví a BMI. Demografické údaje vyšetřených skupin jsou shrnuty v **tabulce 4, 5 a 6**. Jednotlivá data od všech probandů byla získána v průběhu 12 měsíců společně s krevním vzorkem při plánované laboratorní kontrole nebo vyšetření v rámci dispenzarizace v odborných poradnách dětské kliniky. Ve všech případech rodiče dětí byli před zahájením studie informováni a podepsali informovaný souhlas. Studie byla schválena lokální etickou komisí a vedena dle zásad správné klinické praxe v rámci Helsinského protokolu (143).

4.1.1 T1DM

Z celkového počtu pacientů s T1DM (n=113; 64/49 chlapci /dívky) sledovaných v endokrinologické poradně Dětské kliniky Fakultní nemocnice v Plzni bylo vybráno na základě vstupních kritérií 19 T1DM pacientů. Jejich definitivní diagnóza byla stanovena na základě kombinace klinického nálezu, biochemických a imunologických parametrů dle diagnostických kritérií doporučených ISPAD (144; 145). Naši probandi T1DM pacienti byli léčeni inzulinem intenzifikovaným režimem minimálně 4 roky (průměrná doba od diagnózy: 6.5 roku, průměrné dávky inzulinu: 0.92 IU/kg/den, průměrné hodnoty HbA_{1c}: 7.2%). V další fázi studie byla skupina T1DM stratifikována dle hodnoty glykovaného hemoglobinu na skupinu s jedinci,

kteří měli hodnotu $\text{HbA}_{1\text{C}\%} >7\%$ (n=9) a skupinu s jedinci s hodnotou $\text{HbA}_{1\text{C}\%} <7\%$ (n=10) k posouzení vlivu kompenzace onemocnění na hladiny GIT hormonů (9; 146). Pacienti s T1DM trvajícími méně než 4 let, s přidružením dalším autoimunitním onemocněním, onemocněním jater, infekcí včetně pozitivitu *Helicobacter pylori* infekce, hospitalizovaný pro dekompenzaci při diabetické ketoacidóze v posledních 6 měsících nebo pacienti s poruchou renálních funkcí byli vyloučeni ze studie.

4.1.2 Zdravé kontroly

Kontrolní skupina byla tvořena 21 zdravými dětmi, které byly vyšetřeny v rámci hematologické poradny Dětské kliniky Fakultní nemocnice v Plzni pro výskyt trombofilního stavu v jejich příbuzenstvu. Všichni probandi před zařazením do studie absolvovali vstupní kompletní klinické vyšetření. Žádný z jedinců nebyl sledován pro chronické onemocnění, neměl příznaky onemocnění gastrointestinálního traktu, a to se nevyskytovalo ani u nejbližších příbuzných. V době vyšetření nikdo z probandů neužíval antibiotika, nesteroidní antiflogistika nebo jiné přípravky ovlivňující chuť či motilitu trávicího traktu.

4.1.3 FBB

Druhou kontrolní skupinu tvořilo 15 pacientů, kteří byli sledováni v gastroenterologické poradně Dětské kliniky Fakultní nemocnice v Plzni pro FBB. Všichni probandi splňovali římská kritéria III (Rome III – H2b) pro FBB, která zahrnují intermitentní nebo trvalou bolest břicha bez přítomnosti zánětlivého, anatomického, metabolického procesu, který by mohly jinak vysvětlit symptomy pacienta. Obtíže musí pacient udávat nejméně 1x týdně po dobu alespoň 2 měsíců (147). Diagnóza probandů byla stanovena na základě kombinace klinického nálezu, krevního biochemismu, mikrobiologického a parazitologického vyšetření, analýzy moči, ultrasonografie či endoskopického vyšetření trávicího traktu a psychologického vyšetření.

Tabulka 4

Demografické údaje

Charakteristika	T1DM	Kontroly
Jedinci (n)	19	21
Pohlaví (chlapci/dívky)	12/7	10/11
Věk (roky)	13,38 (3,25)	13,36 (3,50)
BMI (kg/m²)	19,49 (4,34)	19,06(2,08)
Věk v době diagnózy (roky)	6,87 (2,47)	-
Doba trvání onemocnění (roky)	6,5 (2,22)	-
Glykemie - nalačno	8,25 (3,38)	-
- po testovacím jídlu (90min)	12,50 (5,59)	5,28 (0,53)
HbA_{1C} (%)	7,2 (0,28)	-
Inzulín (IU)/kg/den (IU)	0,92 (0,28)	-

Legenda: Čísla vyjadřují průměrné hodnoty, čísla v závorkách vyjadřují směrodatné odchylky. **T1DM** – Diabetes mellitus typ 1; **BMI** – body mass index; **HbA_{1C}** – glykovaný hemoglobin; **Inzulín (IU)** – mezinárodní jednotky inzulínu

Tabulka 5

Demografické údaje

Charakteristika	T1DM HbA _{1c} (>7%)	T1DM HbA _{1c} (<7%)	Kontroly
Jedinci (n)	9	10	21
Pohlaví (chlapci/dívky)	5/4	7/3	10/11
Věk (roky)	14,73 (3,43)	12,18 (2,69)	13,36 (3,50)
BMI (kg/m ²)	21,40 (5,37)	17,77 (2,27)	19,06(2,08)
Věk v době diagnózy (roky)	7,54 (2,92)	6,29 (2,47)	
Doba trvání onemocnění (roky)	7,19 (2,80)	5,89 (1,43)	
Glykemie nalačno	8,36 (3,14)	10,51 (3,21)	
po testovacím jídlu (90min)	12,94 (6,21)	13,42(5,27)	
HbA_{1c} (%)	7,9 (0,43)	6,4 (0,31)	
Inzulín (IU)/kg/den (IU)	0,99 (0,34)	0,86 (0,14)	

Legenda: Čísla vyjadřují průměrné hodnoty, čísla v závorkách vyjadřují směrodatné odchylky. **T1DM** – Diabetes mellitus typ 1; **HbA_{1c}** – glykovaný hemoglobin; **BMI** – body mass index; **Inzulín (IU)** – mezinárodní jednotky inzulínu; **T1DM⁺⁷** - Pacienti s T1DM s HbA_{1c} více než 7%; **T1DM⁻⁷** - Pacienti s T1DM s HbA_{1c} méně než 7%.

Tabulka 6

Demografické údaje

Charakteristika	FBB	Kontroly
Jedinci (n)	15	21
Pohlaví (chlapci/dívky)	5/10	10/11
Věk (roky)	10,5 (5,50)	13,36 (3,50)
BMI (kg/m ²)	17,75(3,20)	19,06(2,08)

Legenda: Čísla vyjadřují průměrné hodnoty, čísla v závorkách vyjadřují směrodatné odchylky. **FBB** – funkční bolesti břicha; **BMI** – body mass index.

4.2 Protokol studie

Pacienti a jejich kontroly lačnili během nočních hodin, nejméně 12 hodin před podáním standardizované snídaně (celková energetická hodnota: 1633kJ, cukry: 38.7g, tuky 18.3g, bílkovina 18.1g, vláknina 2.98g). Snídaně odpovídala 3 výměnným jednotkám. Vzorek krve byl odebrán mezi 9-10.00 hod., 90 minut po snídani společně s vzorkem plánované laboratorní kontroly nebo vyšetření v rámci dispenzarizace v odborných poradnách dětské kliniky. Krevní vzorek o objemu 2ml byl odebrán do předem vychlazených EDTA zkumavek, poté byly přidány jednotlivé inhibitory (LINCO DPP-IV inhibitor – ke stanovení GLP-1, Sigma's Protease inhibitor cocktail – ke stanovení Amylinu a Roche's Pefabloc SC serine protease inhibitor – ke stanovení ghrelinu. Následnou centrifugací (2200ot./min.) po dobu 12 minut byla separován vzorek plazmy. Jedinci z kontrolní skupiny a skupiny FBB si neaplikovali žádný inzulín. Další analýza zahrnovala zpracování demografických údajů, pohlaví, výška, váha, trvání onemocnění, HbA_{1c}, aktuální glykémii, denní dávku inzulínu, lipidové spektrum a BMI. BMI bylo počítáno dle vzorce: hmotnost pacienta v kilogramech byla dělena druhou mocninou jeho výšky v metrech.

4.3 Analýza a laboratorní testy

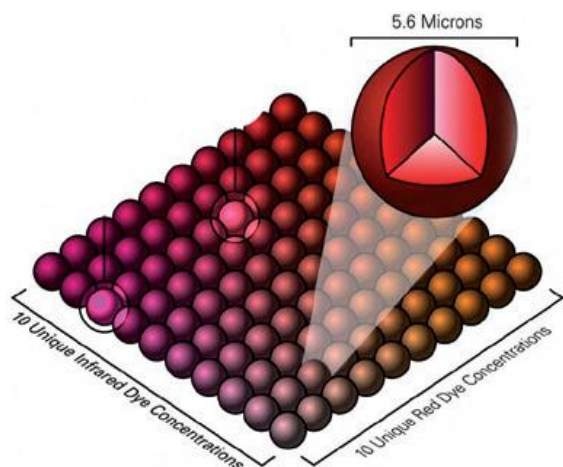
Ke stanovení hladiny jednotlivých GIT hormonů a hormonů související s metabolismem glukózy (aktivní ghrelin, leptin, GIP, aktivní GLP-1, amylin, PP, PYY a inzulín) byl použit multiplexový kit (LINCOp[®]). Stanovení bylo provedeno multiplexovou metodou xMAP na přístroji Luminex. Metoda je založena na kombinaci „sandwichové imunoassaye“ a průtokové cytometrie. Sady mikrokuliček, označených specifickou směsí dvou fluorescenčních barviv (**obrázek 1**), které jsou v různém poměru kovalentně navázány na protilátky specifické pro

každý analyt a fluorescence detekována při průchodu kuliček kyvetou. Inkubace směsi mikrokuliček s 25 μ l vzorku plazmy proběhala v 96 jamkové mikrotitrační destičce během noci při teplotě 4°C. Následně směs byla promyta a přidána směs biotinylovaných protilátek a inkubována při pokojové teplotě 21°C po 30 minut a dále bylo přidáno fluorescenční barvivo steptavidinphycoerytrin a opět byla celá směs inkubována při pokojové teplotě 21°C po dobu 30minut (**Schéma 3**). Detekce fluorescence probíhala dvoustupňově. Mikrosféry s navázaným vzorkem protékaly detekčním kanálem, skrze který probíhají dva laserové paprsky (YAG-laser 532nm a PMT 563-587nm), tím byla snímána fluorescence uvnitř mikrosfér sloužící k její identifikaci a na jejich povrchu k měření fluorescence navázaného vzorku (**Schéma 4**). Přesnost měření byla zajištěna společnostmi Linco dodávanými standardními koncentračními vzorky a všechna měření byla provedena speciálně vyškoleným pracovníkem. Každý vzorek plazmy o objemu 25 μ l byl analyzován při jednom sezení 3x a průměrná hodnota byla statisticky zpracována. Vzorky neabsolvovaly >2 cykly rozmrazení a zmrazení, byly analyzovány najednou. Intra-assay koeficient byl < 11%, a inter-assay < 19%.

C-peptid byl stanoven imunoradiometricky (Immunotech, Česká republika, SR 300 Stratec® instrument). HbA_{1c} byl měřen pomocí kapalinové chromatografie (high performance liquid chromatography - Tosoh G7). Stanovení hodnot lipoproteinů o vysoké hustotě (HDL), nízké hustotě (LDL) a triglyceridů bylo provedeno standardizovanou metodou (GTP-PAP Human®, CHOD-PAP Dialab®). Biochemické parametry byly měřeny v laboratoři klinické biochemie Fakultní nemocnice Plzeň.

Obrázek 1

Mikrotitrační destička

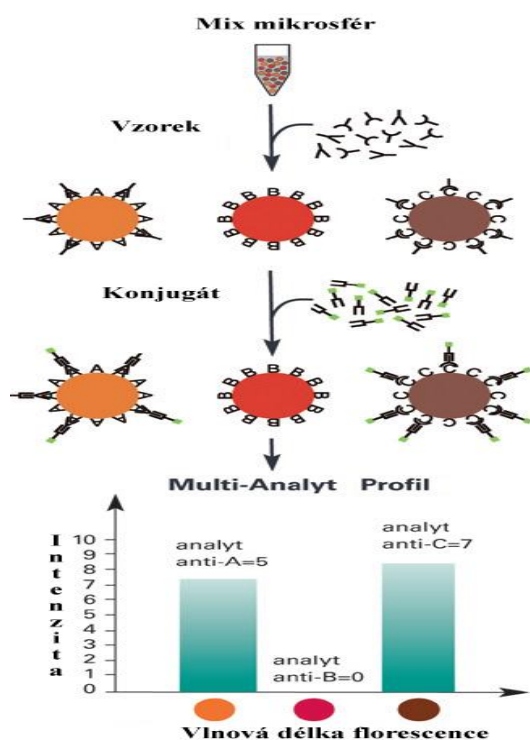


Legenda: Mikrosféry jsou interně fluorescenčně značeny, přičemž v Luminex systému je k dispozici sto setů mikrosfér s odlišnou fluorescencí, a to díky smíchání různých poměrů dvou fluorescenčních barev. Každý set mikrosfér má tedy charakteristikou fluorescenci, na základě které je při průchodu lasery identifikován. Pro značení testovaných vzorků jsou využívány fluorescenční barvy s emisní vlnovou délkou 560–590 nm.

Zdroj: Millipore™

Schéma 3

Inkubace vzorku s mikrosférami a specifickými protilátkami

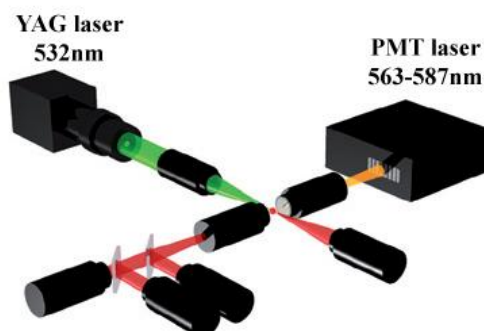
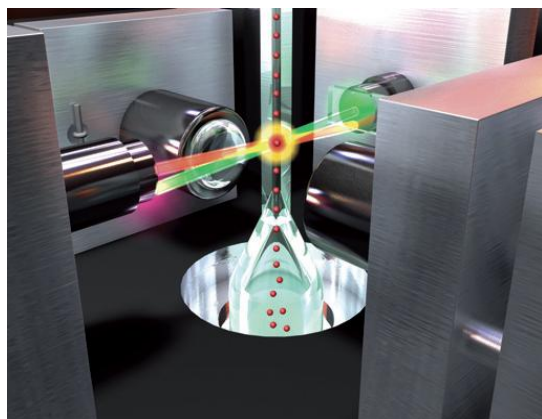


Legenda: Na povrch mikrosfér modifikovaný avidinem jsou kovalentně ukotveny sondy (protilátky). Navazované sondy mají jejich 5'-konce modifikovány aminoskupinou biotinem. Po navázání vzorku jsou přidány biotinylované protilátky s fluorescenčním barvivem steptavidinphycoerytrin. Mikrosféry s navázaným vzorkem protékají detekčním kanálem, skrze který probíhají dva laserové paprsky (YAG-laser - Yttrium-Argon-Germanium laser 532nm a PMT 563-587nm), a je snímána fluorescence uvnitř mikrosfér (identifikace mikrosfér) a na jejich povrchu (měření fluorescence navázaného vzorku).

Zdroj: Millipore™

Schéma 4

Detekčním kanálem s dvěma laserovými paprsky



Zdroj: Millipore™

Legenda: Mikrosféry s navázaným vzorkem protékají detekčním kanálem, skrze který probíhají dva laserové paprsky (YAG-laser laser 532nm a PMT 563-587nm), a je snímána fluorescence uvnitř mikrosfér (identifikace mikrosfér) a na jejich povrchu (měření fluorescence navázaného vzorku).

4.4 Statistika

Hladiny jednotlivých zkoumaných hormonů jsou vyjádřeny pomocí průměrné hodnoty a směrodatné odchylky, mediánu a interkvartilového rozmezí. Pro počítání rozdílnosti mezi skupinami zdravých kontrol a T1DM a skupinami FBB a T1DM byl použit vzhledem k povaze biologických populací neparametrický Wilcoxonův párový test. Hodnocení rozdílnosti skupin T1DM dle úrovně kompenzace onemocnění byl zvolen neparametrický Kruskalův-Wallisův test. Závislosti mezi hladinami jednotlivých hormonů v obou skupinách byly testovány pomocí Spearmanova a Kendallova koeficientu pořadové korelace, taktéž závislost mezi hladinou hormonů a HbA_{1c} (%), BMI (kg/m²), inzulinem (IU/kg) a lipidovým spektrem (HDL, LDL, triglyceridy) byla stanovena užitím Spearmanův a Kendallův koeficientu pořadové korelace. Na závěr pro určení nezávislého prediktivního faktoru byly statisticky významné proměnné podrobeny stepwise regresní analýze. Statistické výpočty byly provedeny statistikem užitím softwaru Statistica[®] (StatSoft, Tulsa - U.S.A.). P-hodnota 0.05 byla považována za hodnotu statisticky významnou.

5 Výsledky

Ve výsledkové části jsou uvedeny výsledky hladin gastrointestinálních hormonů u vyšetřovaných skupin. V jednotlivých sekcích jsou zpracovány skupiny T1DM, pacientů s T1DM stratifikovaných dle hodnoty HbA_{1c} a FBB pacienti. Nejprve jsou uvedeny hladiny gastrointestinálních hormonů v porovnání s kontrolami, dále pak korelační analýza mezi jednotlivými hormony a korelační analýza mezi biochemickými parametry a hladinami hormonů. U skupiny T1DM je uvedena navíc step-wise regresní analýza. Mezi jednotlivými vyšetřovanými skupinami jsme nenalezli signifikantní rozdíly ve věkovém rozložení, rozložení pohlaví, rasy, výšky, váhy a BMI.

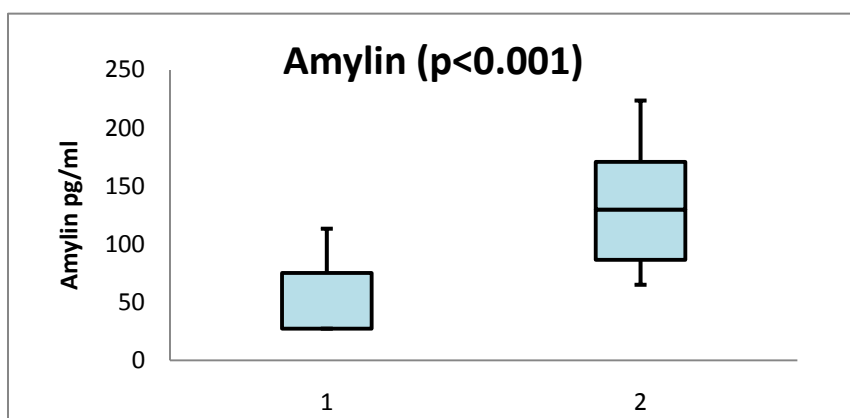
5.1 GIT hormony u T1DM jedinců

5.1.1 GIT hormony

5.1.1.1 Amylin

Plasmatická hladiny celkového amylinu u dětí s T1DM byla signifikantně nižší v porovnání s kontrolní skupinou. (50.11 ± 29.41 pg/ml; medián: 27.40 pg/ml, interkvartilové rozmezí: 27.30-75.40; 129 ± 46.40 pg/ml; medián: 129.96, interkvartilové rozmezí: 86.83-170.86; $p < 0.001$) **graf 1**.

Graf 1

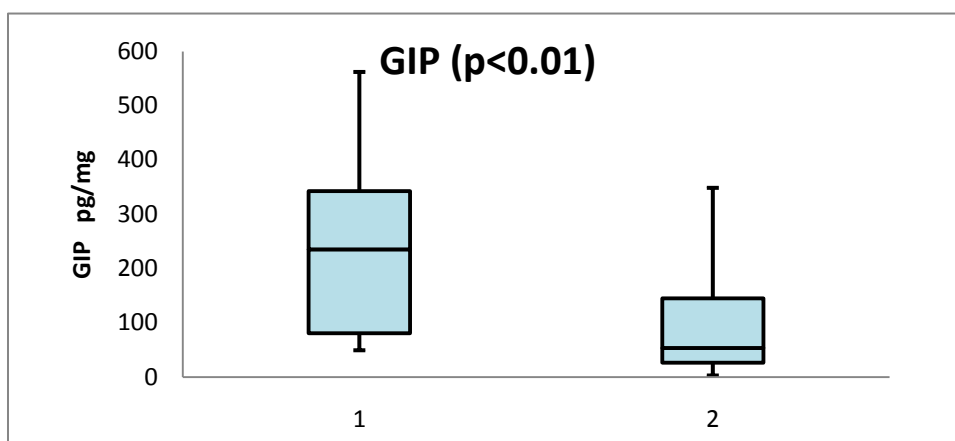


Legenda: Krabicový graf vyjadřují interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** – T1DM; **2** - kontroly; **p** - p-hodnota

5.1.1.2 GIP

Plasmatická hladiny celkového GIP u dětí s T1DM byla signifikantně elevována v porovnání s kontrolní skupinou. (234.21±157.29pg/ml; medián: 235.45pg/ml, interkvartilové rozmezí: 80.74-342.83; 88.30±86.82pg/ml (medián: 53.70 interkvartilové rozmezí: 26.85-145.15; p<0.001) **graf 2**.

Graf 2

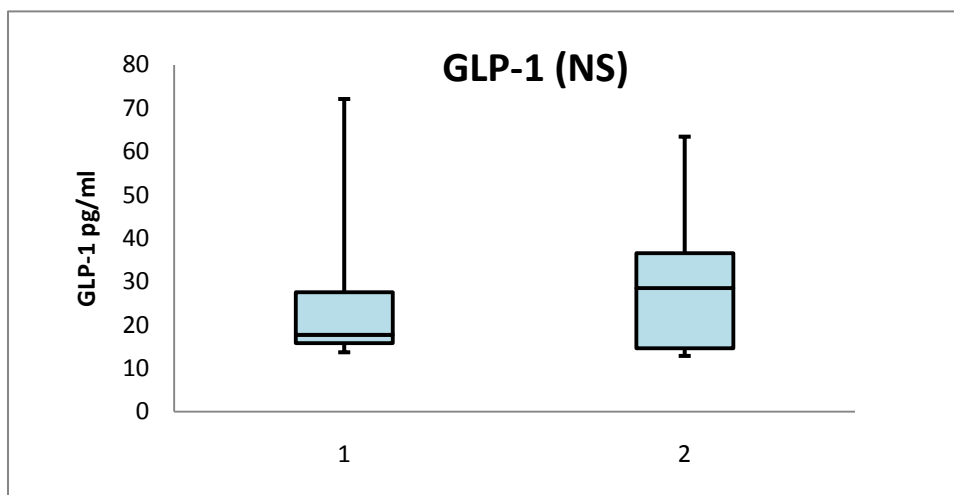


Legenda: Krabicový graf vyjadřují interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** – T1DM; **2** - kontroly; **p** - p-hodnota

5.1.1.3 GLP-1

Statisticky významný rozdíl nebyl nalezen mezi hladinami aktivního GLP-1 u dětí T1DM a jejich kontrol (23.44± 13.51pg/ml medián: 17.75, interkvartilové rozmezí: 15.86-27.60; 29.68 ± 16.49 pg/ml; medián: 28.54pg/ml, interkvartilové rozmezí: 14.65- 36.61; p=0.39) **graf 3**.

Graf 3

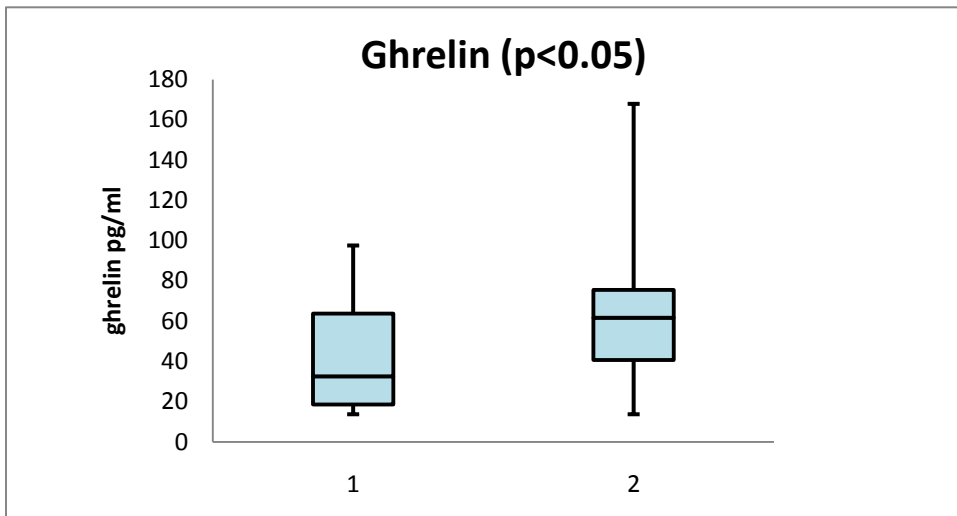


Legenda: Krabicový graf vyjadřují interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** – T1DM; **2** - kontroly; **NS** – nesignifikantní

5.1.1.4 Ghrelin

Plasmatická hladina aktivního ghrelinu u dětí s T1DM byla signifikantně nižší v porovnání s kontrolní skupinou. (41.20±27.91pg/ml; medián: 32.61pg/ml, interkvartilové rozmezí: 18.60-63.57; 66.66±41.72pg/ml; medián: 61.76, interkvartilové rozmezí: 40.75-75.62; p<0.05) **graf 4**.

Graf 4

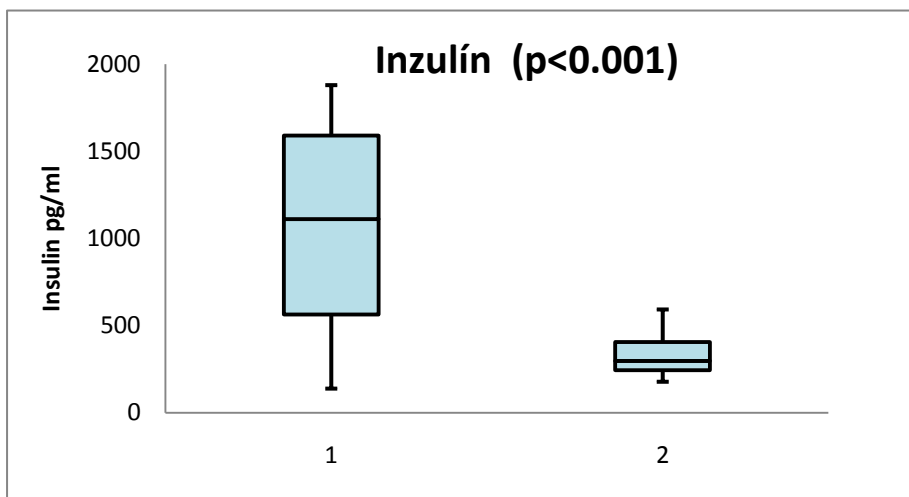


Legenda: Krabicový graf vyjadřují interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** – T1DM ; **2** - kontroly; **p** - p-hodnota

5.1.1.5 Inzulín

Plazmatické hladiny subkutánního inzulínu byly signifikantně elevovány u T1DM dětí v porovnání se zdravými kontrolami. ($1783.44 \pm 2896.72 \text{ pg/ml}$; medián: 1110.58, interkvartilové rozmezí 562.79-1590.22; $323.53 \pm 119.12 \text{ pg/m}$; medián: 296.45; interkvartilové rozmezí 243.04-405.34; $p < 0.001$) **graf 5.**

Graf 5

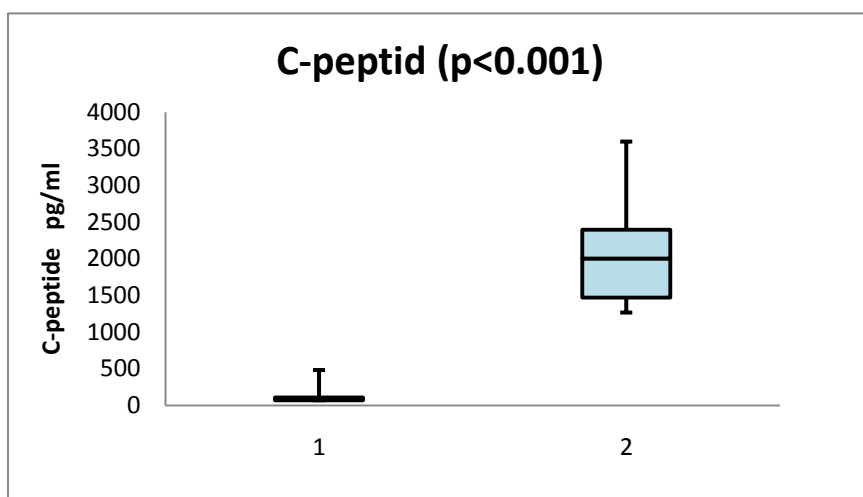


Legenda: Krabicový graf vyjadřují interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** – T1DM; **2** - kontroly; **p** - p-hodnota

5.1.1.6 C-peptid

Plasmatická hladiny stimulovaného C-peptidu u dětí s T1DM byla signifikantně nižší v porovnání s kontrolní skupinou. ($50,45 \pm 96,00$ pg/ml; medián: 21,70, interkvartilové rozmezí: 3,62-43,40; $2072,36 \pm 717,93$ pg/ml; medián: 1945,95, interkvartilové rozmezí: 1410,63-2336; $p < 0.001$) **graf 6**.

Graf 6

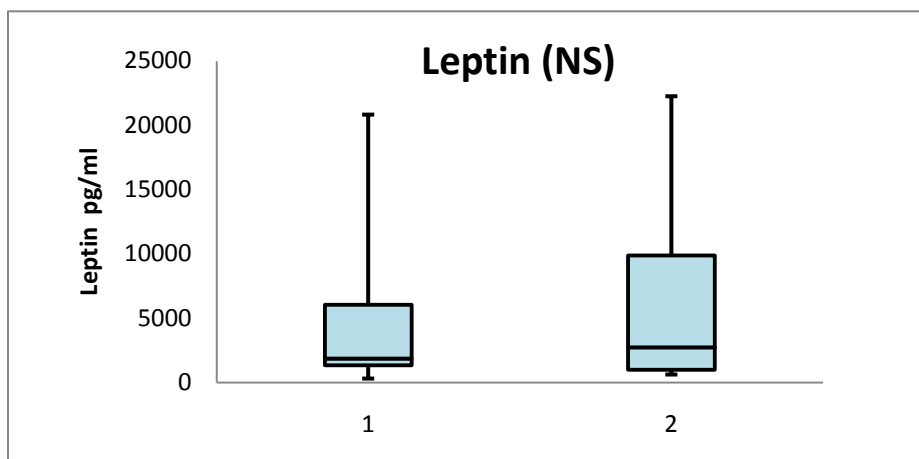


Legenda: Krabicový graf vyjadřují interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** –T1DM; **2** - kontroly; **p** - p-hodnota

5.1.1.7 Leptin

Statisticky významný rozdíl nebyl nalezen mezi hladinami leptinu u dětí T1DM a kontrolami. (4451.68 ± 5698.27 pg/ml; medián: 1857.60 pg/ml, interkvartilové rozmezí: 1333.53-6049.58; 5682.77 ± 6356.17 ; 2734.01 pg/ml, interkvartilové rozmezí: 989.71-9879.76; $p = 0.71$) **graf 7**.

Graf 7



Legenda: Krabicový graf vyjadřují interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** – T1DM; **2** - kontroly; **NS** – nesignifikantní

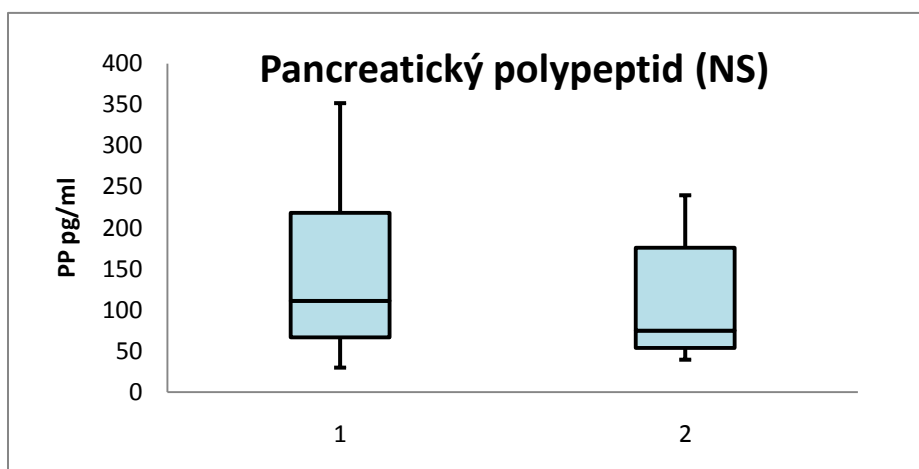
5.1.1.8 PP

Statisticky významný rozdíl mezi hladinami PP u dětí T1DM a jejich kontrol nebyl nalezen.

(139.00 ± 96.38 pg/ml; medián: 111.18 pg/ml, interkvartilové rozmezí: 66.85-73-218.24; 106.16 ± 64.42 pg/ml; medián: 74.96 pg/ml, interkvartilové rozmezí: 54.08-176.07; $p=0.21$)

graf 8.

Graf 8

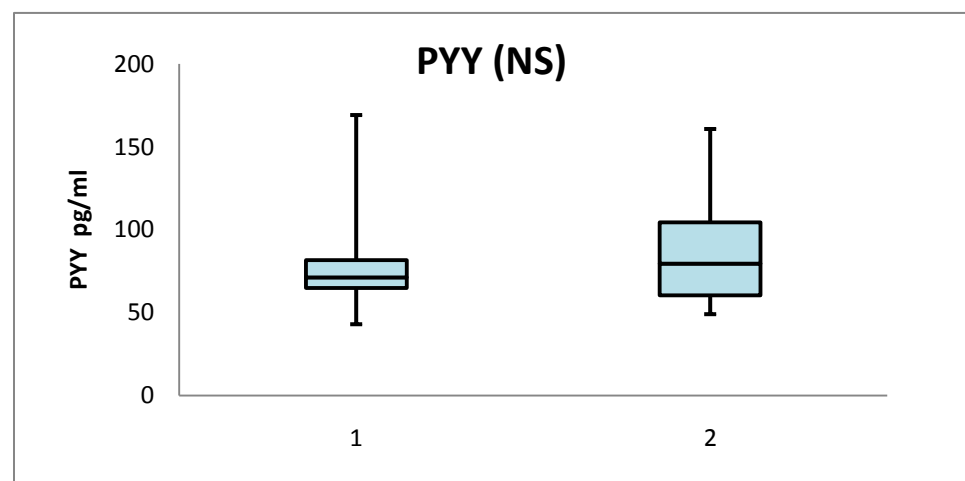


Legenda: Krabicový graf vyjadřují interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** – T1DM; **2** - kontroly; **NS** – nesignifikantní

5.1.1.9 PYY

Statisticky významný rozdíl mezi hladinami celkového PYY u dětí T1DM a jejich kontrol nebyl nalezen. (78.87 ± 30.12 pg/ml; medián: 71.24pg/ml, interkvartilové rozmezí: 64.84-81.78; 84.75 ± 29.71 pg/ml; medián:79.55 interkvartilové rozmezí:60.39-104.54; $p=0.55$, **graf 9.**

Graf 9



Legenda: Krabicový graf vyjadřují interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** – T1DM; **2** - kontroly; **NS** – nesignifikantní

5.1.2 Korelační analýza

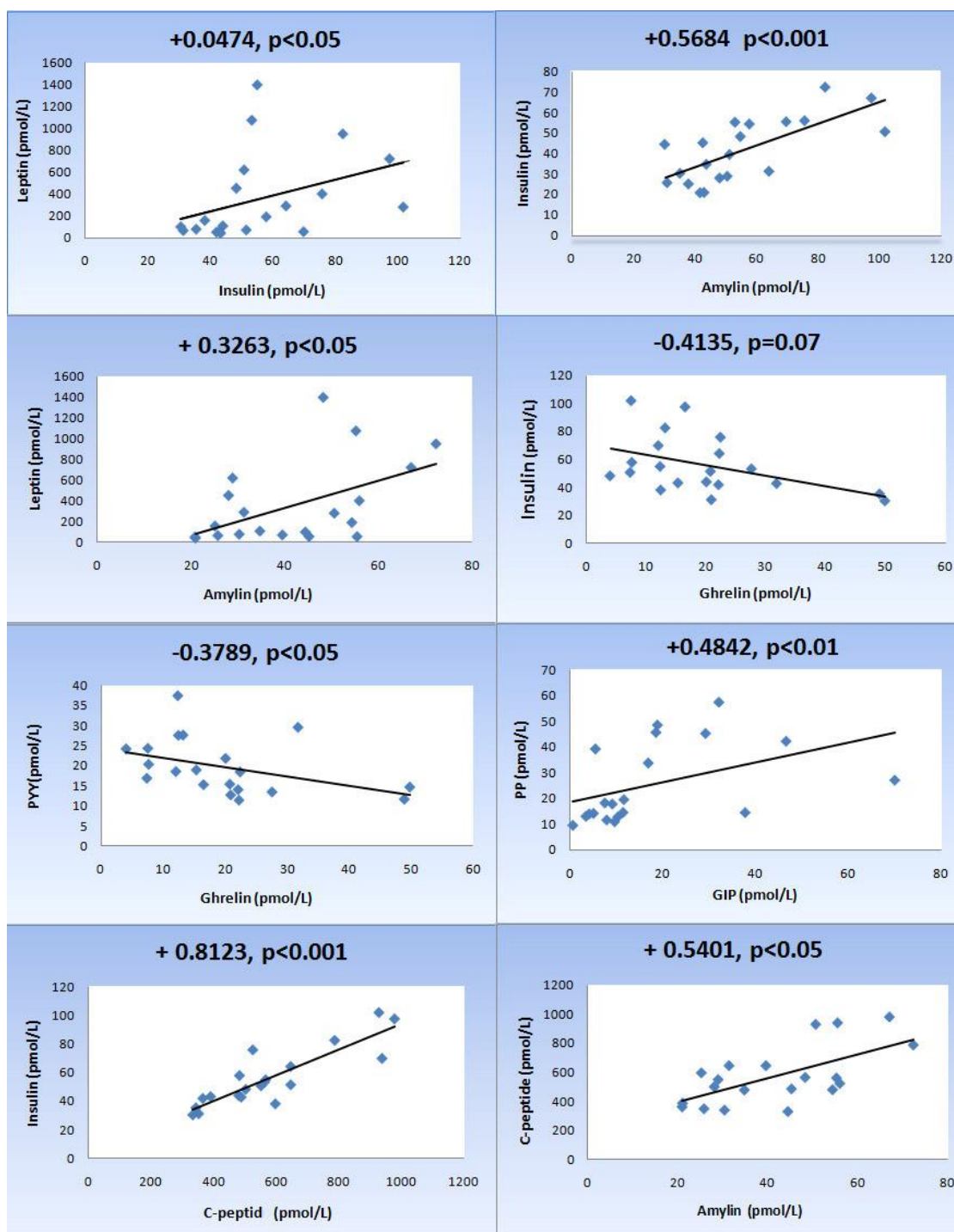
5.1.2.1 Korelace plasmatických hladin GIT peptidů u T1DM a kontrolní skupiny

5.1.2.1.1 Kontrolní skupina

Amylin koreloval s inzulínem ($r=0.7474$; $p<0.001$), C-peptidem ($r=0.5401$; $p<0.001$) a leptinem ($r=0.4857$; $p<0.05$) a inzulín také pozitivně koreloval s leptinem ($r=0.5383$; $p<0.05$) a C-peptidem ($r=0.8123$, $p<0.001$). Negativní korelace byla nalezena mezi GIP a GLP-1 ($r=0.3810$, $p<0.05$), a PP ($r=0.6526$; $p<0.05$). Dále jsme prokázali negativní korelace mezi ghrelinem a PYY ($r= - 0.5323$; $p<0.05$). **Tabulka č. 6**

Tabulka č. 6

Korelace plasmatických hladin GIT peptidů u zdravých kontrol



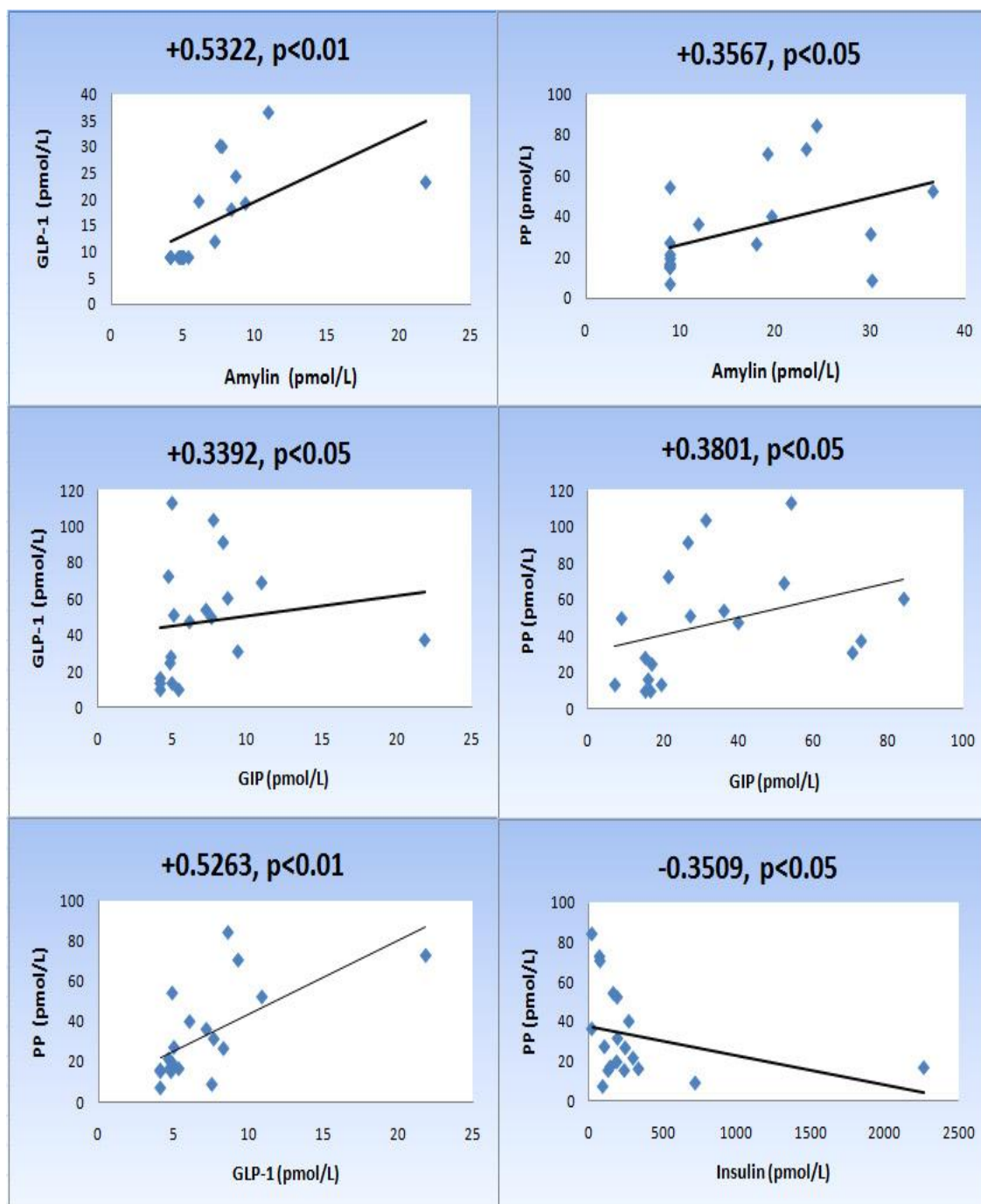
Legenda: Jednotlivé korelace mezi hladinami GIT hormonů u zdravých kontrol; **p** – p-hodnota

5.1.2.1.2 T1DM pacienti

Ve skupině T1DM pacientů byla nalezeny pozitivní korelace mezi amylinem a GLP-1 ($r=0.7834$; $p<0.05$) a PP ($r= 0.4867$; $p<0.05$). GIP koreluje s GLP-1 ($r=0.4903$; $p<0.05$) a PP ($r=0.5702$; $p<0.05$). GLP-1 pozitivně koreluje s PP ($r=0.7223$; $p<0.01$) a PYY ($r=0.4569$; $p<0.05$), a také hladina inzulínu negativně korelovala plasmatickou hladinou PYY ($r= -0.4704$; $p<0.05$). **Tabulka č. 7**

Tabulka č. 7

Korelace plasmatických hladin GIT peptidů u T1DM



Legenda: Jednotlivé korelace mezi hladinami GIT hormonů u pacientů s diabetes mellitus typ 1(T1DM); **p** – p-hodnota

5.1.2.2 Korelace plazmatických hladin GIT peptidů a biochemických parametrů T1DM dětí

Ve skupině T1DM byly hladiny vyšetřovaných hormonů korelovány s hodnotami pacientova HbA_{1c}%, aktuální glykemie, BMI, hladinou TC, HDL-C, LDL-C, a TG, dávkou inzulínu na kilogram pacientovy hmotnosti (IU/D), věku, pohlaví, věku v době diagnózy a délce trvání onemocnění. BMI T1DM dětí koreluje s GLP-1 ($r=0.4642$; $p<0.05$), leptinem ($r=0.5151$; $p<0.05$), a amylinem ($r=0.5193$; $p<0.05$). Dávky inzulínu negativně korelovala s aktuální glykemií ($r=-0.3595$; $p<0.05$). Hladiny ghrelinu korelují se sérovými hladinami HDL ($r=0.4760$; $p<0.05$) a negativně s TG ($r=-0.5674$; $p<0.01$) a dávkou inzulínu (insulin - IU/kg/den) ($r=-0.5366$; $p<0.05$). Byly nalezeny také negativní korelace mezi ghrelinem a HbA_{1c}% ($r=-0.6864$; $p<0.01$), leptin a TG ($r=-0.6351$; $p<0.01$). Žádná z dalších korelací nebyla statisticky signifikantní.

5.1.2.3 Stepwise regresní analýza

K odhalení nezávislých proměnných byla statisticky signifikantní data zpracována regresní analýzou. Glykovaný hemoglobin HbA_{1c} ($r'=0.592$; $p<0.05$), dávka inzulínu ($r'=0.583$; $p<0.05$) a HDL ($r'=0.790$; $p<0.001$) byly odhaleny jako nezávislé faktory pro plazmatickou hladinu ghrelinu. BMI ($r'=0.818$; $p<0.001$), TG ($r'=-0.793$; $p<0.001$) a cholesterol ($r'=-0.527$; $p<0.05$). Pro ostatní GIT peptidy nebyly nalezeny žádné nezávislé proměnné.

5.2 GIT hormony u skupiny jedinců hladinou glykovaného hemoglobinu nad 7% (T1DM⁺⁷) a pod 7% (T1DM⁻⁷)

5.2.1 GIT hormony

5.2.1.1 Amylin

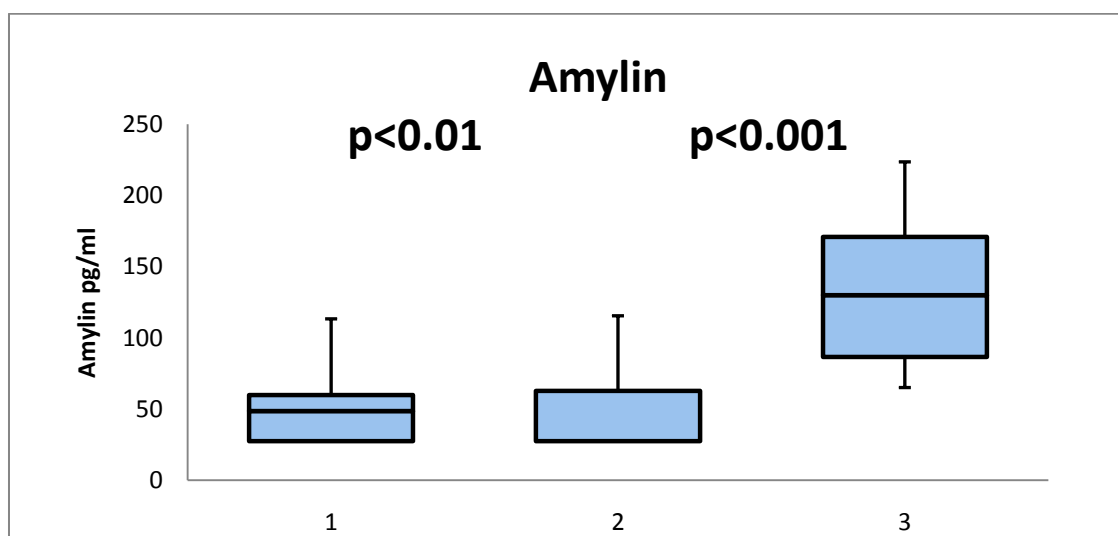
5.2.1.1.1 T1DM⁺⁷

Plazmatická hladina amylinu u dětí s T1DM⁺⁷ byla signifikantně nižší v porovnání s kontrolní skupinou. (59.73±34.63pg/ml; medián: 48.67pg/ml, interkvartilové rozmezí: 27.40-92.96; 129±46.50pg/ml; medián: 129.93, interkvartilové rozmezí: 86.83-170.86; p<0.01) **graf 10**.

5.2.1.1.2 T1DM⁻⁷

Plazmatická hladiny Amylinu u dětí s T1DM⁻⁷ byla signifikantně nižší v porovnání s kontrolní skupinou. (39.41±18.77pg/ml; medián: 27.40pg/ml, interkvartilové rozmezí: 27.40-59.34; 129±46.40pg/ml; medián: 129.93, interkvartilové rozmezí: 86.83-170.86; p<0.001) **graf 10**.

Graf 10



Legenda: Krabicový graf vyjadřuje interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** – T1DM s HbA_{1C} nad 7% (T1DM⁺⁷); **2** - T1DM s HbA_{1C} pod 7% (T1DM⁻⁷) **3** - zdravé kontroly; **p** - p-hodnota

5.2.1.2 GIP

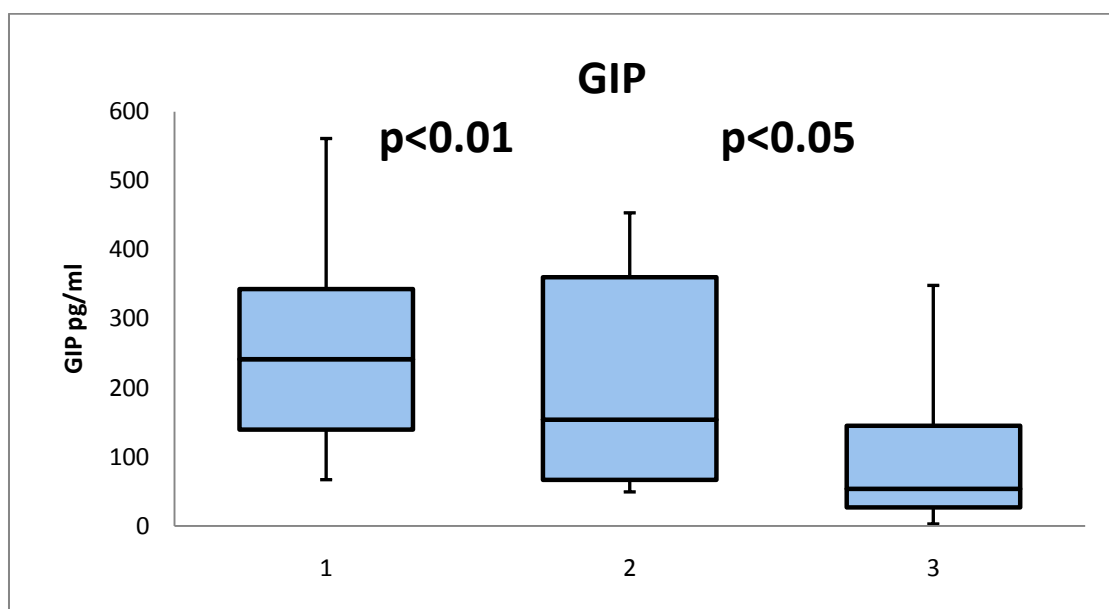
5.2.1.2.1 T1DM⁺⁷

Plazmatická hladiny GIP u dětí s T1DM⁺⁷ byla signifikantně elevována v porovnání s kontrolní skupinou. (264.15±167.44pg/ml; medián: 241.35pg/ml, interkvartilové rozmezí: 139.37-342.83; 88.30±86.82pg/ ml (medián: 53.70 interkvartilové rozmezí: 26.85-145.15; p<0.05) **graf 11**.

5.2.1.2.2 T1DM⁻⁷

Plazmatická hladiny GIP u dětí s T1DM⁻⁷ byla signifikantně elevována v porovnání s kontrolní skupinou. (200.95±147.51pg/ml; medián: 153.63pg/ml, interkvartilové rozmezí: 66.80-360.00; 88.30±86.82pg/ ml (medián: 53.70 interkvartilové rozmezí: 26.85-145.15; p<0.05, **graf 11**.

Graf 11



Legenda: Krabicový graf vyjadřuje interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** – T1DM s HbA_{1C} nad 7% (**T1DM⁺⁷**); **2** - T1DM s HbA_{1C} pod 7% (**T1DM⁻⁷**) **3** - zdravé kontroly; **p** - p-hodnota

5.2.1.3 GLP-1

5.2.1.3.1 T1DM⁺⁷

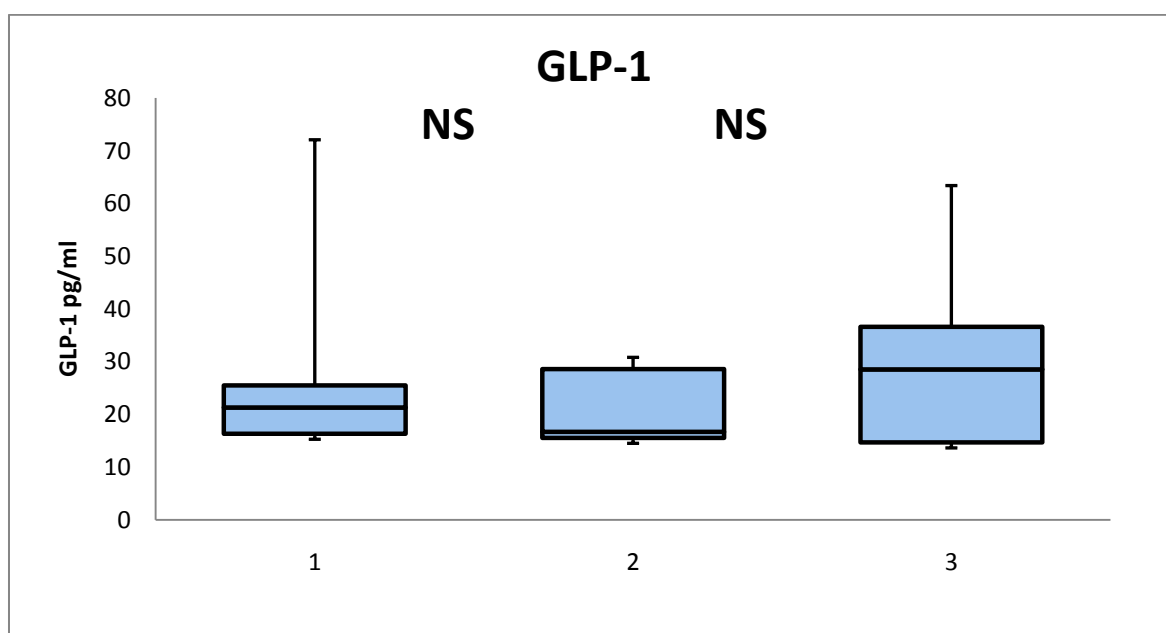
Statisticky významný rozdíl nebyl nalezen mezi GLP-1 hladinami u dětí s T1DM⁺⁷ a jejich kontrol. (26.50± 17.33 pg/ml; medián: 21.98pg/ml, interkvartilové rozmezí: 16.29-25.47; 29.68 ± 16.49 pg/ml; medián: 28.54pg/ml, interkvartilové rozmezí: 14.65- 36.61; p=0.82)

graf 12.

5.2.1.3.2 T1DM⁻⁷

Statisticky významný rozdíl nebyl nalezen mezi GLP-1 hladinami u dětí T1DM⁻⁷ a jejich kontrol. (20.03± 6.91pg/ml; medián: 16.70pg/ml, interkvartilové rozmezí: 15.52-28.60; 29.68 ± 16.49pg/ml; medián: 28.54pg/ml, interkvartilové rozpětí: 14.65- 36.61; p=0.82) **graf 12.**

Graf 12



Legenda: Krabicový graf vyjadřuje interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** – T1DM s HbA_{1C} nad 7% (T1DM⁺⁷); **2** - T1DM s HbA_{1C} pod 7% (T1DM⁻⁷); **3** - zdravé kontroly; **NS** – nesignifikantní

5.2.1.4 Ghrelin

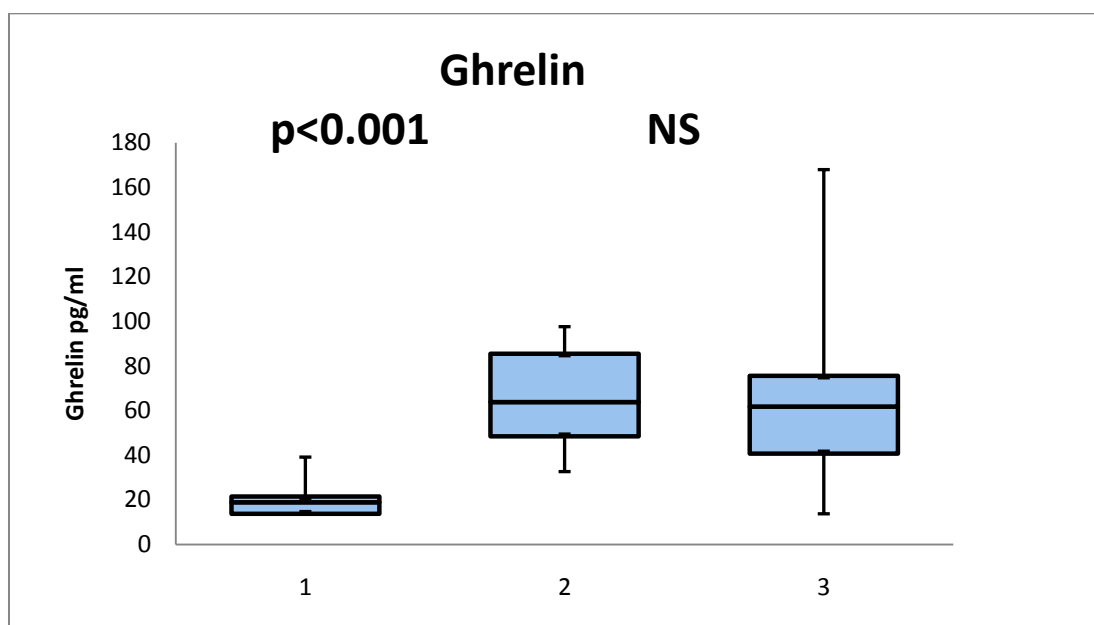
5.2.1.4.1 T1DM⁺⁷

Plazmatická hladina ghrelinu u dětí s T1DM⁺⁷ byla signifikantně nižší v porovnání s kontrolní skupinou. (20.10±8.15pg/ml; medián: 18.96pg/ml, interkvartilové rozmezí: 13.70-21.48; 66.66±41.72pg/ml; medián: 61.76, interkvartilové rozmezí: 40.75-75.62; p<0.001) **graf 13**.

5.2.1.4.2 T1DM⁻⁷

Statisticky významný rozdíl nebyl nalezen mezi ghrelinu a hladinami u dětí T1DM⁻⁷ a jejich kontrol (64.64±22.42pg/ml; medián:63.87pg/ml, interkvartilové rozmezí: 48.01-85.51; 66.66±41.72pg/ml; medián: 61.76, interkvartilové rozmezí: 40.75-75.62; p=0.60) **graf 13**.

Graf 13



Legenda: Krabicový graf vyjadřuje interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** – T1DM s HbA_{1C} nad 7% (T1DM⁺⁷); **2** - T1DM s HbA_{1C} pod 7% (T1DM⁻⁷); **3** - zdravé kontroly; **p** - p-hodnota; **NS** – nesignifikantní

5.2.1.5 Inzulín

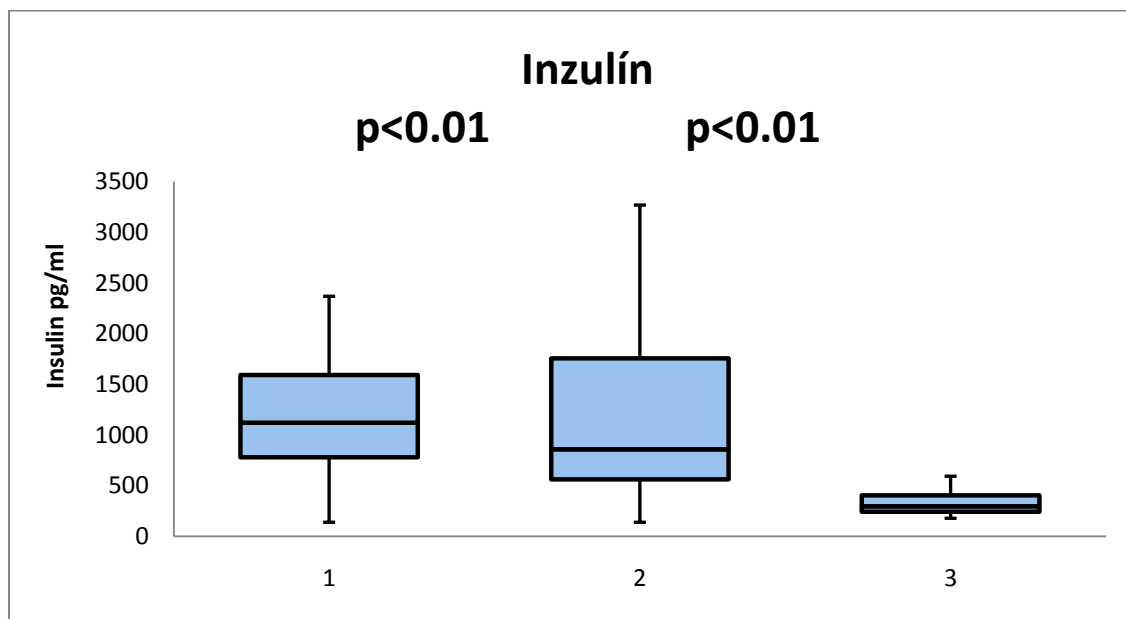
5.2.1.5.1 T1DM⁺⁷

Plazmatické hladiny subkutánního inzulínu byly signifikantně elevovány u T1DM⁺⁷ dětí v porovnání se zdravými kontrolami. (1346.74±1126.22pg/ml; medián: 1120.53, interkvartilové rozmezí 779.91-1590.22; 323.53±119.12pg/ml; medián: 296.45; interkvartilové rozmezí 243.04-405.34; p<0.001) **graf 14**.

5.2.1.5.2 T1DM⁻⁷

Plazmatické hladiny subkutánního inzulínu byly signifikantně elevovány u T1DM⁻⁷ dětí v porovnání se zdravými kontrolami. (2268.67± 4116.99pg/ml; medián: 859.15, interkvartilové rozmezí 562.79-1755.46; 323.53±119.12pg/m; medián: 296.45; interkvartilové rozmezí 243.04-405.34; p<0.05) **graf 14**.

Graf 14



Legenda: Krabicový graf vyjadřuje interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** – T1DM s HbA_{1C} nad 7% (T1DM⁺⁷); **2** - T1DM s HbA_{1C} pod 7% (T1DM⁻⁷); **3** - zdravé kontroly; **p** - p-hodnota

5.2.1.6 C-peptid

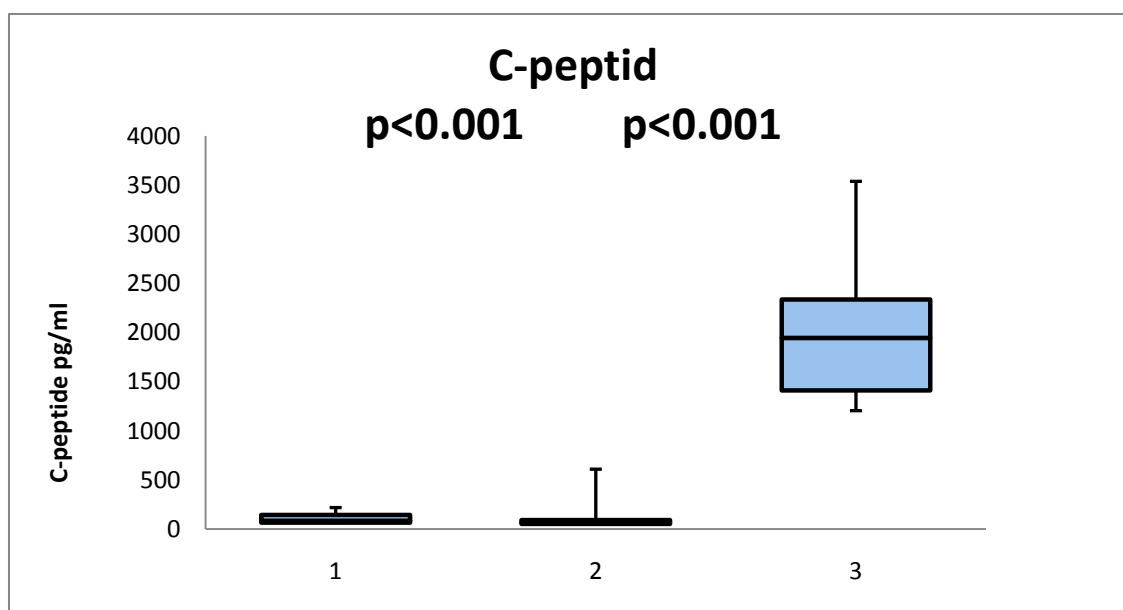
5.2.1.6.1 T1DM⁺⁷

Plazmatická hladiny stimulovaného C-peptidu u dětí s T1DM⁺⁷ byla signifikantně nižší v porovnání s kontrolní skupinou. (36,86±50,65pg/ml; medián: 21,70pg/ml, interkvartilové rozmezí: 3,62-79,57; 2072,36±717,93pg/ml; medián: 1945,95, interkvartilové rozmezí: 1410,63-2336; p<0.001) **graf 15**.

5.2.1.6.2 T1DM⁻⁷

Plazmatická hladiny stimulovaného C-peptidu u dětí s T1DM⁻⁷ byla signifikantně nižší v porovnání s kontrolní skupinou. (62,57±125,51pg/ml; medián: 19,89, interkvartilové rozmezí: 3,62-43,40; 2072,36±717,93 pg/ml; medián: 1945,95, interkvartilové rozmezí: 1410,63-2336; p<0.001) **graf 15**.

Graf 15



Legenda: Krabicový graf vyjadřuje interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** – T1DM s HbA_{1C} nad 7% (T1DM⁺⁷); **2** - T1DM s HbA_{1C} pod 7% (T1DM⁻⁷); **3** - zdravé kontroly; **p** - p-hodnota

5.2.1.7 Leptin

5.2.1.7.1 T1DM⁺⁷

Statisticky významný rozdíl nebyl nalezen mezi hladinami leptinu u dětí T1DM⁺⁷ a jejich kontrol. (4706.35±6291.25pg/ml; medián: 1911.90pg/ml interkvartilové rozmezí: 987.32-6285.40; 5682.77±6356.17; 2734.01pg/ml, interkvartilové rozmezí: 989.71-9879.76; p=0.56)

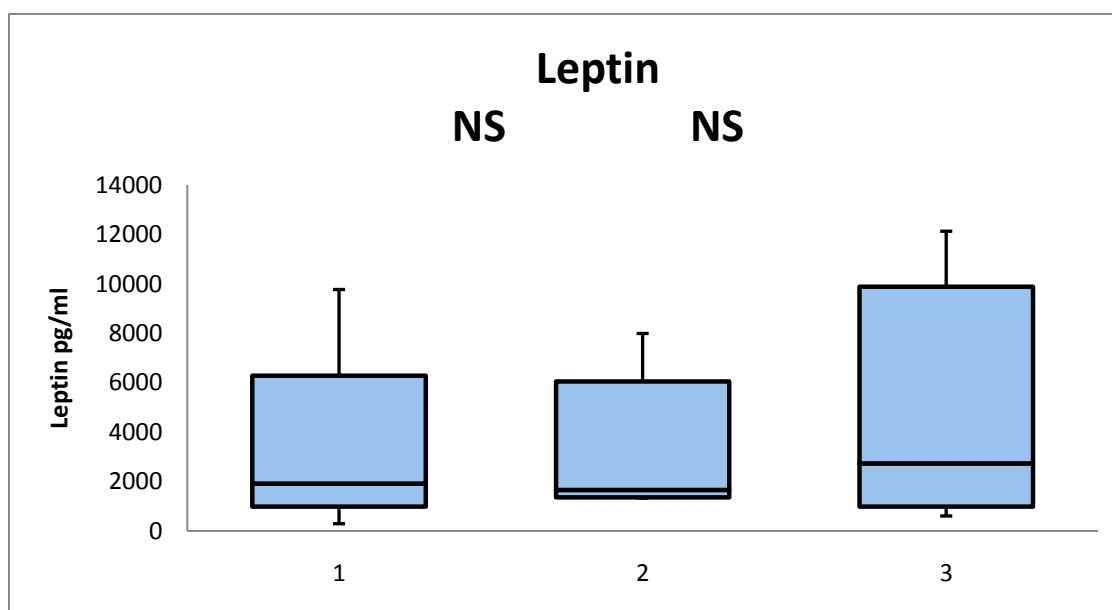
graf 16.

5.2.1.7.2 T1DM⁻⁷

Statisticky významný rozdíl nebyl nalezen mezi hladinami leptinu u dětí T1DM⁻⁷ a jejich kontrol. (4168.71±5325.37pg/ml; medián: 1662.53pg/ml interkvartilové rozmezí: 1362.01-6049.58; 5682.77±6356.17; 2734.01pg/ml, interkvartilové rozmezí: 989.71-9879.76; p=1.00)

graf 16.

Graf 16



Legenda: Krabicový graf vyjadřuje interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** – T1DM s HbA_{1C} nad 7% (T1DM⁺⁷); **2** - T1DM s HbA_{1C} pod 7% (T1DM⁻⁷); **3** - zdravé kontroly; **NS** – nesignifikantní

5.2.1.8 PP

5.2.1.8.1 T1DM⁺⁷

Statisticky významný rozdíl mezi hladinami PP u dětí T1DM⁺⁷ a jejich kontrol nebyl nalezen.

(144.70± 85.94pg/ml; medián: 141.19pg/ml, interkvartilové rozmezí: 66.85-218.24;

106.16±64.42pg/ml; medián: 74.96pg/ml, interkvartilové rozmezí: 54.08-176.07; p=0.18)

graf 17.

5.2.1.8.2 T1DM⁻⁷

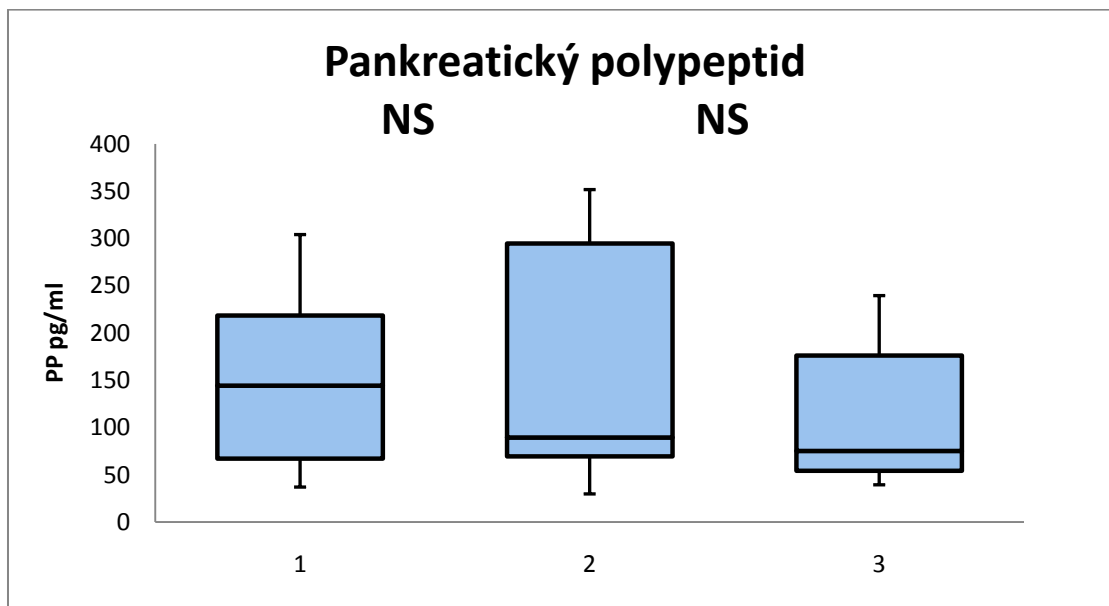
Statisticky významný rozdíl mezi hladinami PP u dětí T1DM⁻⁷ a jejich kontrol nebyl nalezen.

(132.67±111.83pg/ml; medián: 89.44pg/ml, interkvartilové rozmezí: 69.45-294.49;

106.16±64.42pg/ml; medián: 74.96pg/ml, interkvartilové rozmezí: 54.08-176.07; p=0.51)

graf 17.

Graf 17



Legenda: Krabicový graf vyjadřuje interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu 1 – T1DM s HbA_{1C} nad 7% (T1DM⁺⁷); 2 - T1DM s HbA_{1C} pod 7% (T1DM⁻⁷); 3 - zdravé kontroly; NS – nesignifikantní

5.2.1.9 PYY

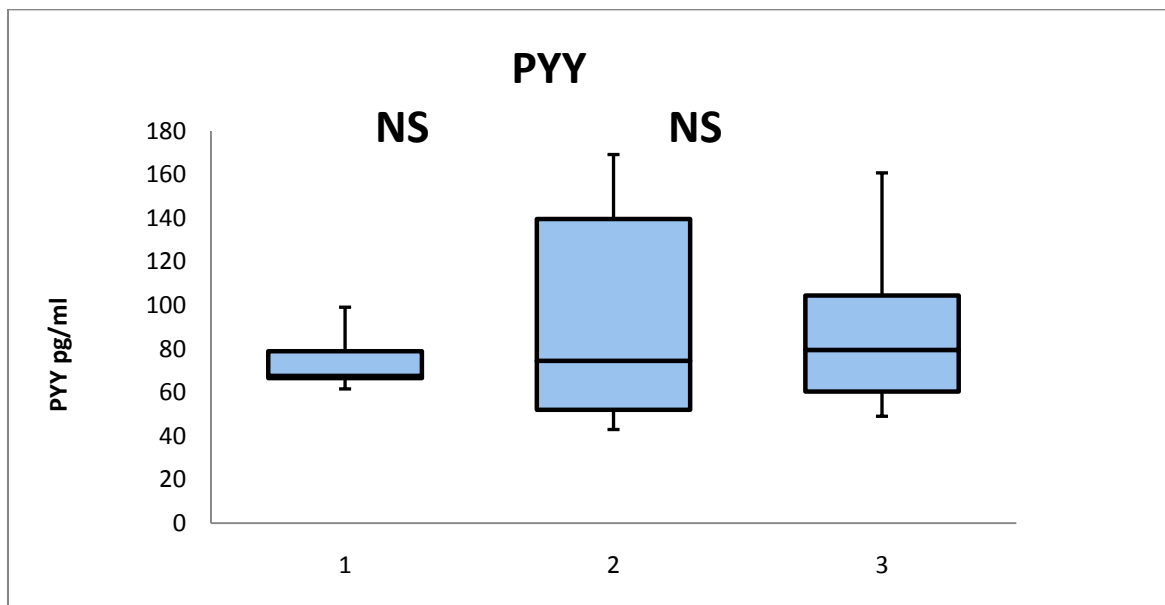
5.2.1.9.1 T1DM⁺⁷

Statisticky významný rozdíl mezi hladinami PYY u dětí T1DM⁺⁷ a jejich kontrol nebyl nalezen. (73.36±11.32pg/ml; medián: 67.53pg/ml, interkvartilové rozmezí: 66.60-78.87; 84.75±29.71pg/ml; medián: 79.55 interkvartilové rozmezí: 60.39-104.54; p=0.57) **graf 18**.

5.2.1.9.2 T1DM⁻⁷

Statisticky významný rozdíl mezi hladinami PYY u dětí T1DM⁻⁷ a jejich kontrol nebyl nalezen. (85.00 ± 42.62pg/ml; medián: 74.53pg/ml, interkvartilové rozmezí: 52.00 -139.65; 84.75±29.71pg/ml; medián: 79.55pg/ml, interkvartilové rozmezí: 60.39-104.54; p=0.71) **graf 18**.

Graf 18



Legenda: Krabicový graf vyjadřuje interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** – T1DM s HbA_{1C} nad 7% (T1DM⁺⁷); **2** - T1DM s HbA_{1C} pod 7% (T1DM⁻⁷); **3** - zdravé kontroly; **NS** – nesignifikantní

5.2.2 Korelační analýza

5.2.2.1 Korelace plasmatických hladin GIT peptidů a biochemických parametrů u skupin T1DM⁺⁷

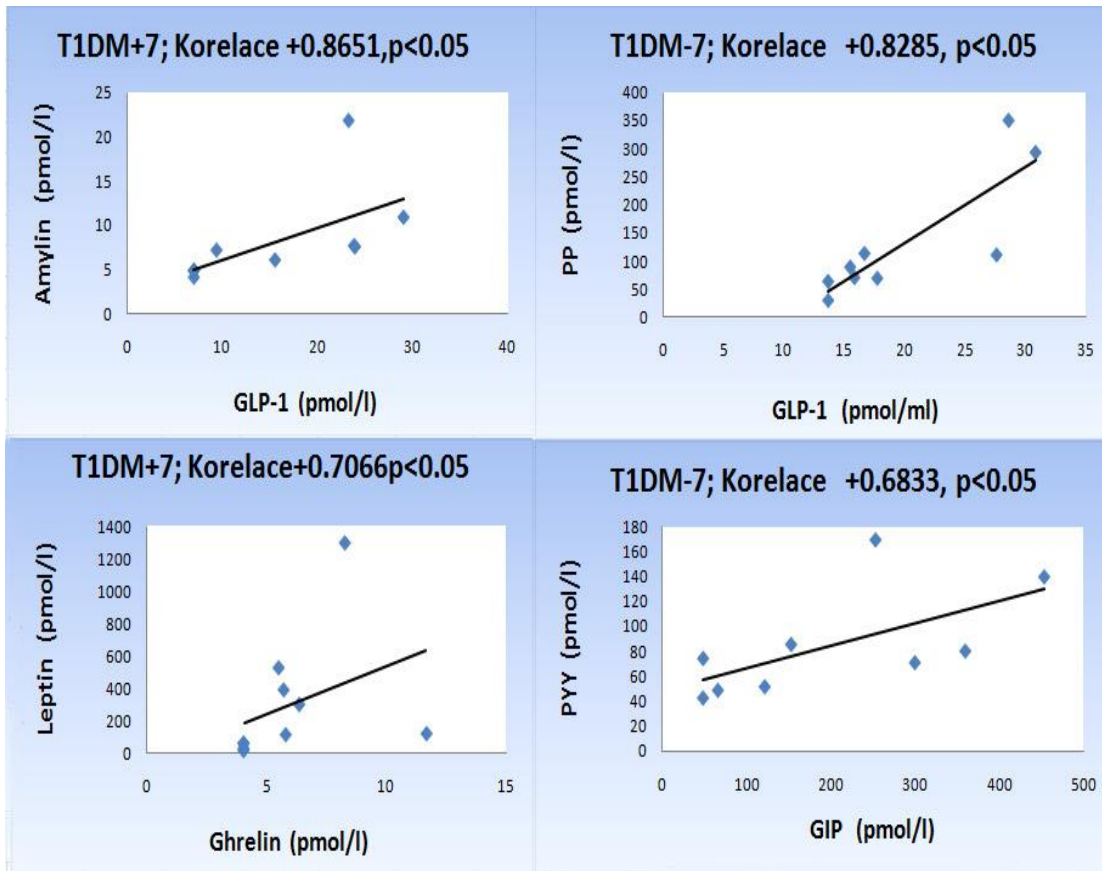
Ve skupině T1DM⁺⁷ pacientů byly nalezeny pozitivní korelace mezi amylinem a GLP-1 ($r=0.8651$; $p<0.05$) a hladinou ghrelinu a leptinu ($r=0.7066$; $p<0.05$). Dále amylin negativně koreluje s hladinou HbA_{1C}% ($r= -0.8896$; $p<0.01$). Ghrelin negativně koreluje s hladinou TG ($r= -0.8442$; $p<0.05$), leptin negativně s TG ($r= -0.7212$; $p<0.05$) a pozitivně v BMI (0.6727 ; $p<0.01$). PP negativně koreluje s dávkou inzulínu - IU/kg/den ($r= -0.6809$; $p<0.05$). Žádná z další korelací nebyla statisticky signifikantní. **Tabulka č.8**

5.2.2.2 Korelace plasmatických hladin GIT peptidů a biochemických parametrů u skupin T1DM⁻⁷

Ve skupině T1DM⁻⁷ pacientů byla nalezena pozitivní korelace ghrelinu a HDL ($r= 0.8000$; $p<0.05$). GLP-1 pozitivně koreluje s hladinou PP ($r= -0.8285$; $p<0.05$), GIP koreluje s PP ($r= 0.6833$, $p<0.05$) a leptin negativně s PYY ($r= -0.7000$; $p<0.05$). Žádná z další korelací nebyla statisticky signifikantní. **Tabulka č. 8.**

Tabulka č.8

Korelace plasmatických hladin GIT peptidů u skupin T1DM⁺⁷ a T1DM⁻⁷



Legenda: Jednotlivé korelace mezi hladinami GIT hormonů u T1DM pacientů dle kompenzace onemocnění; **1** – T1DM s HbA_{1C} nad 7% (**T1DM⁺⁷**); **2** - T1DM s HbA_{1C} pod 7% (**T1DM⁻⁷**); **p** - p-hodnota

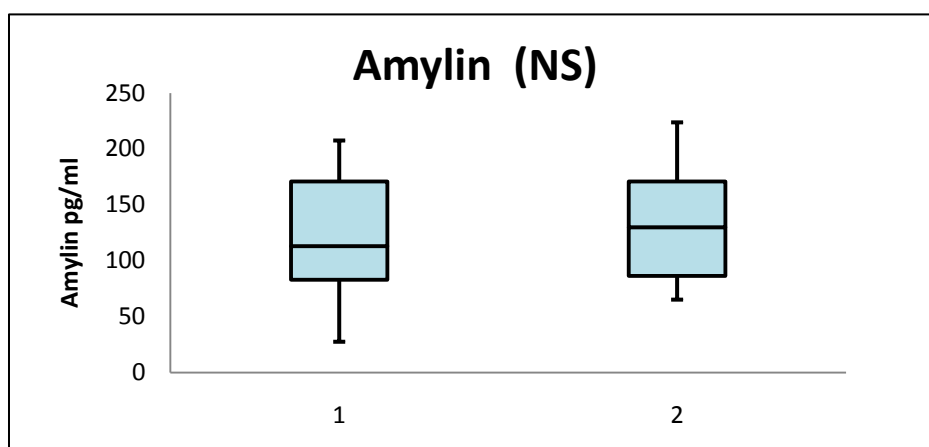
5.3 GIT hormony a FBB

5.3.1 GIT hormony

5.3.1.1 Amylin

Plazmatická hladiny celkového amylinu u dětí s FBB se signifikantně nelišila v porovnání s kontrolní skupinou. (132.92 ± 68.68 pg/ml; medián: 113.38 pg/ml, interkvartilové rozmezí: 83.25-207.40; 129 ± 46.40 pg/ml; medián: 129.96, interkvartilové rozmezí: 86.83-170.86) **graf 20.**

Graf 20

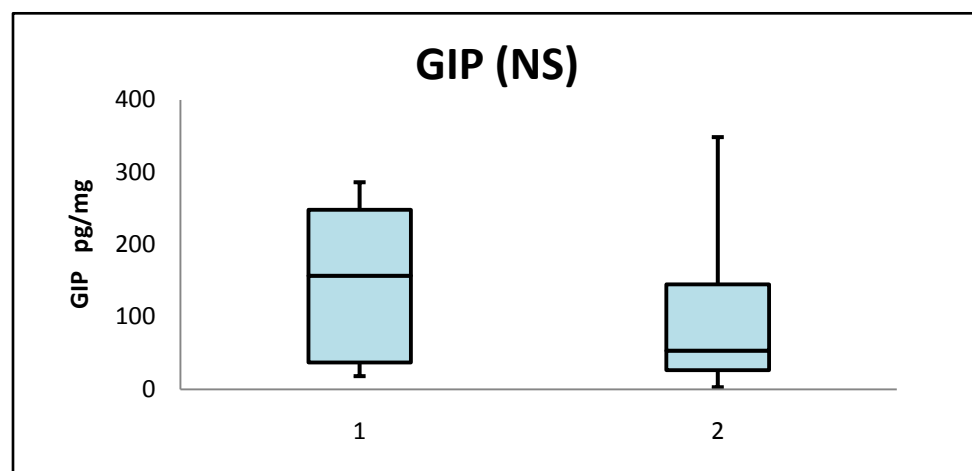


Legenda: Krabicový graf vyjadřují interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** – Pacienti s funkčními bolestmi břicha; **2** - kontroly; **NS** – nesignifikantní

5.3.1.2 GIP

Plazmatická hladiny celkového GIP u dětí u dětí s FBB se signifikantně nelišila v porovnání s kontrolní skupinou. (141.56 ± 104.24 pg/ml; medián: 157.25 pg/ml, interkvartilové rozmezí: 37.40-248.02; 88.30 ± 86.82 pg/ml (medián: 53.70 interkvartilové rozmezí: 26.85-145.15) **graf 21.**

Graf 21

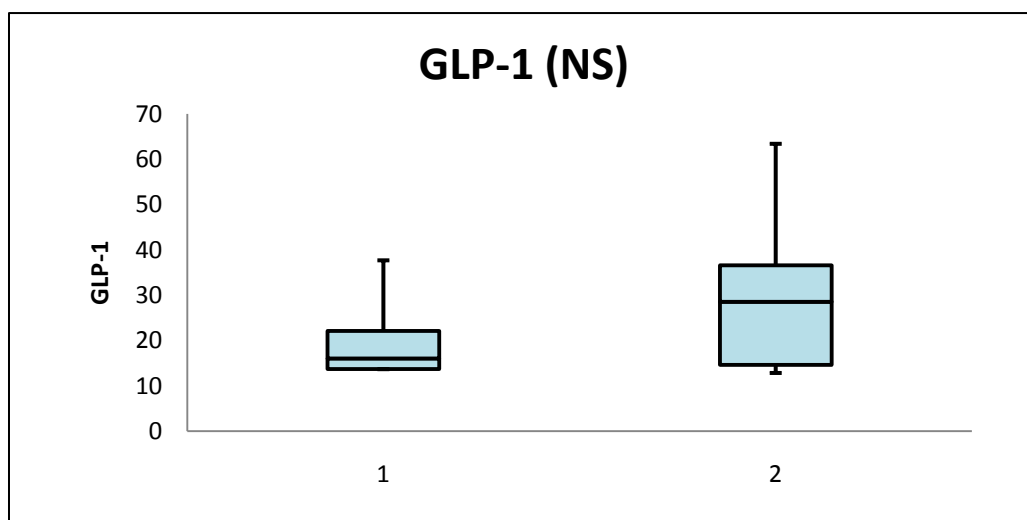


Legenda: Krabicový graf vyjadřují interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** - Pacienti s funkčními bolestmi břicha; **2** - kontroly; **NS** – nesignifikantní

5.3.1.3 GLP-1

Statisticky významný rozdíl nebyl nalezen mezi hladinami aktivního GLP-1 u dětí s FBB v porovnání s kontrolní skupinou. (19.31 ± 7.38 pg/ml medián: 16.05, interkvartilové rozmezí: 13.70-22.15; 29.68 ± 16.49 pg/ml; medián: 28.54 pg/ml, interkvartilové rozmezí: 14.65-36.61) **graf 22**.

Graf 22

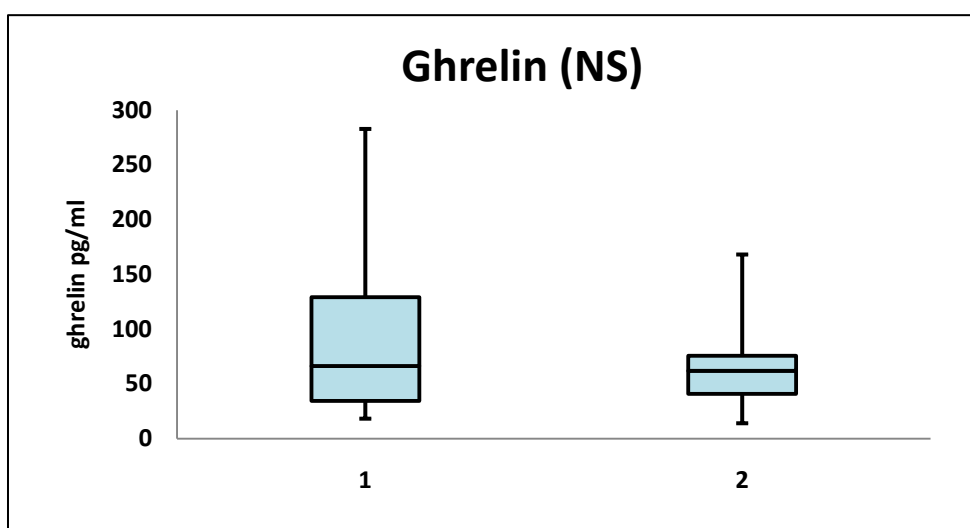


Legenda: Krabicový graf vyjadřují interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** - Pacienti s funkčními bolestmi břicha; **2** - kontroly; **NS** – nesignifikantní

5.3.1.4 Ghrelin

Plazmatická hladina aktivního ghreluinu u dětí u dětí s FBB se signifikantně nelišila v porovnání s kontrolní skupinou. ($86.84 \pm 73.23 \text{ pg/ml}$; medián: 66.32 pg/ml , interkvartilové rozmezí: $34.44\text{-}129.09$; $66.66 \pm 41.72 \text{ pg/ml}$; medián: 61.76 , interkvartilové rozmezí: $40.75\text{-}75.62$) **graf 23**.

Graf 23

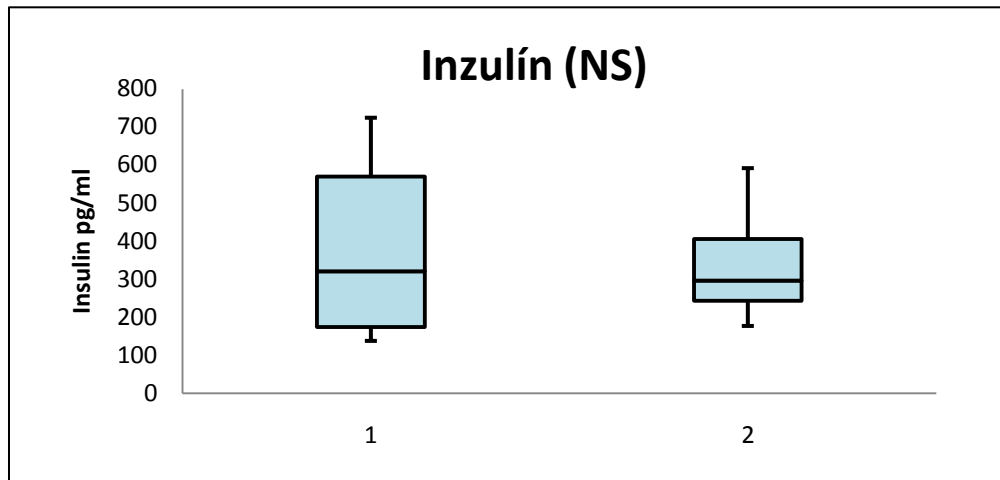


Legenda: Krabicový graf vyjadřují interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** - Pacienti s funkčními bolestmi břicha; **2** - kontroly; **NS** – nesignifikantní

5.3.1.5 Inzulín

Plazmatické hladiny vlastního inzulínu u dětí s FBB se signifikantně nelišily v porovnání s kontrolní skupinou. v porovnání se zdravými kontrolami. ($396.91 \pm 211.40 \text{ pg/ml}$; medián: 320.66 , interkvartilové rozmezí $174.21\text{-}570.10$; $323.53 \pm 119.12 \text{ pg/m}$; medián: 296.45 ; interkvartilové rozmezí $243.04\text{-}405.34$) **graf 24**.

Graf 24

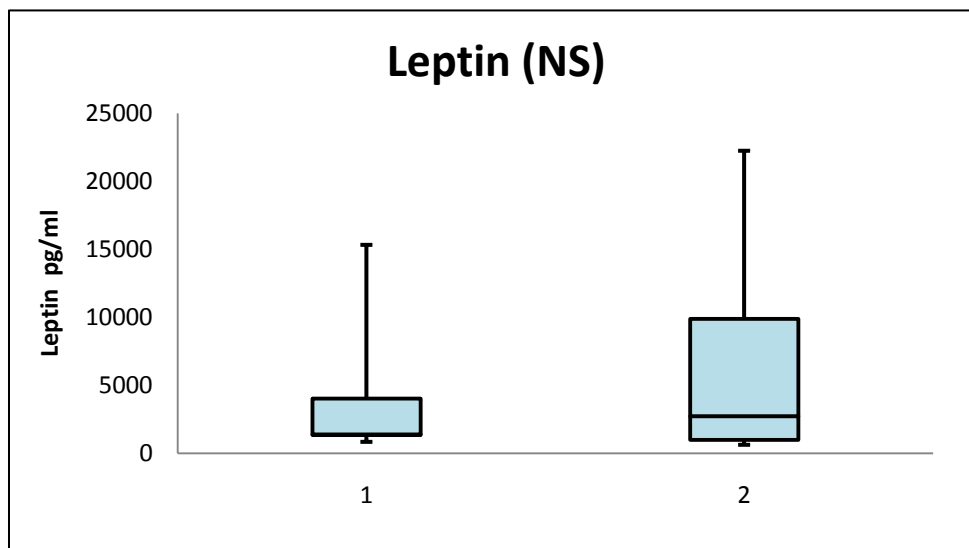


Legenda: Krabicový graf vyjadřují interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** - Pacienti s funkčními bolestmi břicha; **2** - kontroly; **NS** – nesignifikantní

5.3.1.6 Leptin

Statisticky významný rozdíl nebyl nalezen mezi hladinami leptinu u dětí s recidivujícími bolestmi břicha v porovnání s kontrolní skupinou. (3248 ± 4015.55 pg/ml; medián: 1333.74 pg/ml, interkvartilové rozmezí: 824.21-4022.39; 5682.77 ± 6356.17 ; 2734.01 pg/ml, interkvartilové rozmezí: 989.71-9879.76) **graf 25**.

Graf 25

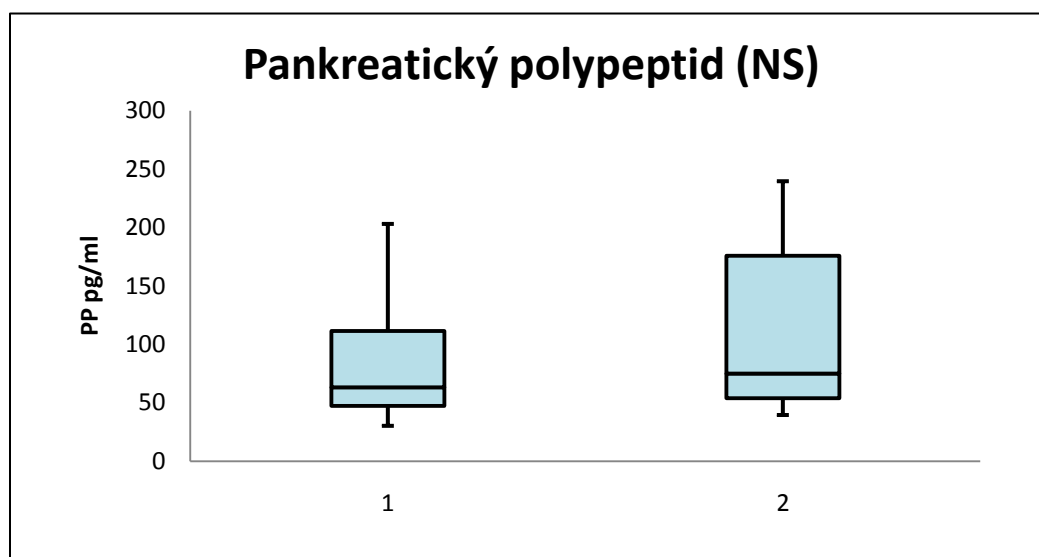


Legenda: Krabicový graf vyjadřují interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** - Pacienti s funkčními bolestmi břicha; **2** - kontroly; **NS** – nesignifikantní

5.3.1.7 PP

Statisticky významný rozdíl mezi hladinami PP u dětí u dětí s recidivujícími bolestmi břicha v porovnání s kontrolní skupinou. ($80.61 \pm 48.31 \text{ pg/ml}$; medián: 63.38 pg/ml , interkvartilové rozmezí: $47.35\text{-}111.62$; $106.16 \pm 64.42 \text{ pg/ml}$; medián: 74.96 pg/ml , interkvartilové rozmezí: $54.08\text{-}176.07$) **graf 26**.

Graf 26

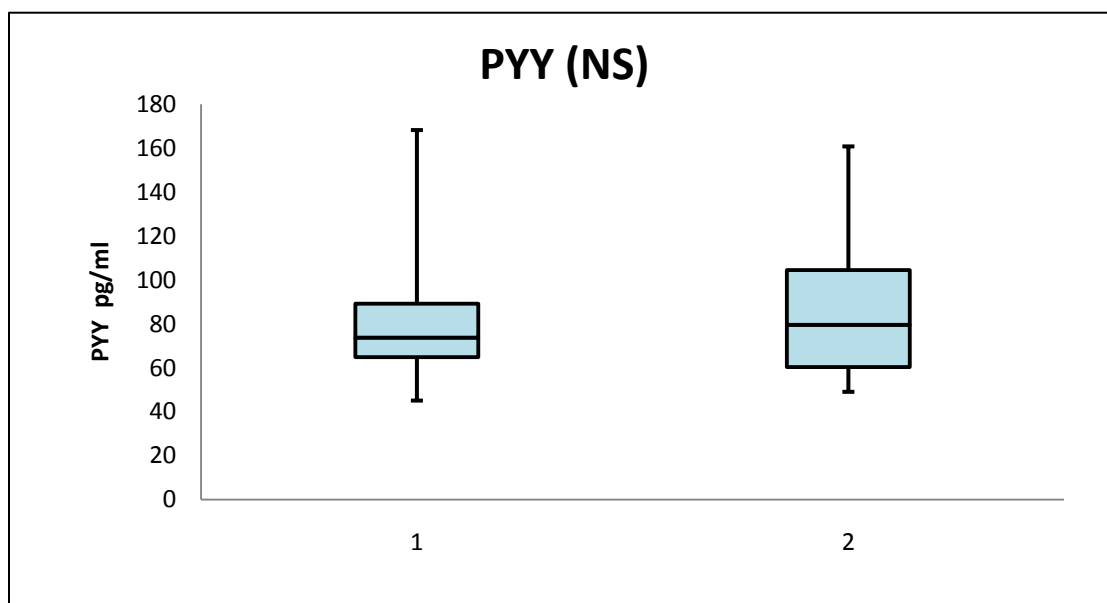


Legenda: Krabicový graf vyjadřují interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** - Pacienti s funkčními bolestmi břicha; **2** - kontroly; **NS** – nesignifikantní

5.3.1.8 PYY

Statisticky významný rozdíl mezi hladinami celkového PYY u dětí u dětí s recidivujícími bolestmi břicha v porovnání s kontrolní skupinou. ($83.74 \pm 28.98 \text{ pg/ml}$; medián: 77.25 pg/ml , interkvartilové rozmezí: $68.59-93.01$; $84.75 \pm 29.71 \text{ pg/ml}$; medián: 79.55 interkvartilové rozmezí: $60.39-104.54$) **graf 27**.

Graf 27



Legenda: Krabicový graf vyjadřují interkvartilové rozmezí. Horizontální linie označuje medián naměřených hodnot, úsečky maximální a minimální získanou hodnotu; **1** - Pacienti s recidivujícími bolestmi břicha; **2** - kontroly; **NS** – nesignifikantní

6 Diskuze

V naší studii jsme stanovili cirkulující hladiny sedmi hormonů (GIT hormony a hormony související s metabolismem glukózy) u T1DM dětí. V současné literatuře není dostačující množství prací zabývajících se GIT hormony u dětských T1DM pacientů. Dle dostupných zdrojů neexistuje práce hodnotící 7 hormonů současně z pohledu jejich postprandiálních hladin, vzájemných interakcí a jejich vlivu na metabolismus. Výsledky studie ukázaly signifikantní rozdíly v hladinách jednotlivých hormonů mezi T1DM a jejich kontrolami, tak současně mezi podskupinami T1DM rozdělené dle kompenzace základního onemocnění v porovnání se zdravou populací. U T1DM pacientů po stanovení diagnózy a zahájení inzulínoterapie dochází k restituci funkce β -buňky a na přechodnou dobu dochází k zlepšení produkce vlastního inzulínu – tzv. „Honeymoon period“ (148). Záměrně jsme do studie zařadili pacienty již s delší dobou trvání T1DM, abychom zamezili možné interferenci se zachovalou sekrecí β -buněk pankreatu. Studovaná kohorta byla složena z T1DM jedinců, u nichž onemocnění trvalo průměrně 6,50 roků (SD \pm 2,23 roku). Naměřená nízká hladina stimulovaného C-peptidu ukazuje minimální sekreci vlastního inzulínu u těchto jedinců (**Graf 1 a 4**) (142).

6.1 Amylin

Analýzou výsledků jsme prokázali signifikantně snížené hladiny amylinu u T1DM pacientů ($p < 0.001$), ke stejným závěrům dospěly i další studie provedené na dospělé populaci (149). Souhlasně hladiny amylinu byly signifikantně nízké i u obou skupiny T1DM⁺⁷ a T1DM⁻⁷. Autoimunitní destrukcí β -buněk dochází k nejen k absolutní depleci vlastního inzulínu, ale i k nedostačené sekreci amylinu a tím jsou jeho postprandiální hladiny nízké. Tento vztah podporuje zjištěná pozitivní korelace mezi amylinem a hladinou C-peptidu u kontrolní skupiny.

Zjištěné nízké hladiny amylinu a C-peptidu potvrzují nízkou sekreci destruovaných β -buněk pankreatu u T1DM jedinců. Nízké hladiny amylinu v postprandiální periodě způsobují nedostačenou supresi sekrece glukagonu α -buňkami pankreatu a nezpomalení evakuace žaludku (47; 51).

Již několik desítek let se snažíme co nejdokonaleji substituovat inzulín, jenž má zcela zásadní úlohu v léčbě T1DM. Z výsledků vyplývá, že bychom tuto snahu koncentrovat i na substituci druhého hormonu produkovaného β -buňkami, k jehož depleci také dochází jejich destrukcí - amylinu. Vzhledem k jeho účinkům bychom mohli dosáhnout lepší kompenzace T1DM. V současné době byl vytvořen syntetický analog amylinu. Prozatím je testován a vyvíjen k léčbě T1DM v kombinaci s inzulínem pro dospělou populaci. Ve většině studií na menším počtu probandů je shodně popisována redukce exkurzí postprandiální glykemie, snížení hladiny HbA_{1c} a hmotnosti probandů a to bez vyšší incidence hypoglykemií nebo nutnosti navýšení množství aplikovaného inzulinu (150; 151; 152; 153; 154; 155; 156). Autoři tří studií provedených na juvenilních T1DM došli k podobným závěrům, i když byly provedeny na malém vzorku pacientů ($n \leq 12$) (157; 158; 159). Částečné rozdílné výsledky jsou prezentovány u rozsáhlých studií dvojitě zaslepených placebem kontrolovaných provedené na dospělé populaci. Jedna studie potvrzuje výše uvedené výsledky (160), naopak Eldeman a spol. popsali také redukcii exkurzí postprandiální glykemie, hmotnosti probandů nikoliv však snížení hladiny HbA_{1c} (161).

Vliv amylinu na lepší kompenzaci onemocnění podporují i naše výsledky. Ve skupině se špatnou kompenzací onemocnění T1DM⁺⁷ hladina amylinu signifikantně negativně korelovala s HbA_{1c}% ($p < 0.05$). Také jsme našli signifikantní korelace mezi amylinem a GLP-1 ($p < 0.05$) a dále mezi amylinem a PP ($p < 0.05$) ve skupině T1DM, nikoliv však v kontrolní skupině. Korelace mezi amylinem a GLP-1 ($p < 0.01$) je opět silnější ve skupině T1DM⁺⁷. Nízké hladiny GLP-1 jsou popisovány u T1DM a jsou spojeny poruchou metabolismu glukózy,

nižším „inkretin efektem“. Shodně změny cirkulujících hladin PP jsou popisovány u T1DM jedinců. Přesný patofyziologický mechanismus vzájemného ovlivnění není prozatím znám.

Na základě dostupných informací se domníváme, že užití amylinu nebo jeho analoga by zlepšilo kompenzaci onemocnění a prognózu dětských T1DM pacientů.

6.2 Inkretiny

6.2.1 GIP

Role GIP ve vztahu k T1DM dětských pacientů je stále předmětem výzkumu. Výsledky dvou studií prokázaly normální hodnoty GIP po zahájení inzulínoterapie u nově diagnostikovaných mladých T1DM jedinců (80; 162). Naše výsledky ukazují signifikantní elevaci hladiny GIP ve srovnání s kontrolní skupinou. K shodnému závěru dospěli i Nakanome a spol. (81). Další studie prokázala také elevované postprandiální hladiny GIP u jedinců s maturity-onset diabetem. Domníváme se, že rozdílnost mezi výsledky studií je dána rozdílnými soubory pacientů (80; 162). Naši vyšetřovanou skupinu tvořili probandi léčení pro diabetes mellitus již několik let ($6,50 \pm 2,23$ roku) a s téměř nulovou vlastní produkcí inzulínu (nízká hodnota stimulovaného C-peptidu). Skupinu pacientů předchozích dvou studií byla tvořena z nově diagnostikovaných T1DM jedinců. Je známo, že po zahájení inzulínoterapie dochází na určitou dobu k zlepšení funkce β -buněk pankreatu - tzv. „Honeymoon period“ (148). I přes neustálou autoimunitní destrukci β -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu, nedochází k úplné destrukci a část β -buněk přežívá i několik let od stanovení diagnózy (163). Lynn et al popsal spojitost mezi hyperglykemií a nižší povrchovou expresí GIRP (78).

Předpokládáme, že postprandiálních elevace hladin GIT u T1DM je tvořena kontra-regulačním mechanismem ve snaze kompenzovat nižší počet GIPR. Naši domněnku podporují i rozdílné hladiny GIP u skupin T1DM s rozdílnou kompenzací T1DM. U skupiny špatně

kompenzované skupiny T1DM⁷ elevace GIP odpovídala signifikantnějším statistickému rozdílu ($p < 0.001$). U pacientů s dobrou kompenzací T1DM⁷ byla elevace oproti kontrolní skupině také signifikantní ($p < 0.01$). GIP také pozitivně koreluje s GLP-1 a PP ve skupině T1DM, tak v kontrolní skupině. Je možné spekulovat, že vznikají jako kotreregulační mechanismus porušeného metabolismu glukózy.

Přesný patofyziologický mechanismus vzájemného ovlivnění není prozatím znám. Snaha o farmakologické ovlivnění patofyziologické dráhy GIP bude pravděpodobně současné době obtížně uskutečnitelná vzhledem k nižší expresi aktivních GIPR.

6.2.2 GLP-1

Role GLP-1 ve vztahu k dětských T1DM je stále předmětem výzkumu. Naše pracovní skupina nenalezla signifikantní rozdíly mezi T1DM a zdravou populací, ačkoli u T1DM měla hladina GLP-1 tendenci k nižším hodnotám. Výsledky naší studie jsou ve shodě se závěry studie vypracované skupinou Carla a spol., kteří také popsali nesignifikantní rozdíly v postprandiálních hladinách GLP-1 mezi skupinou dospělých T1DM a zdravými jedinci, avšak u jedinců T1DM popsali nižší „inkretin efekt“ (porovnání odpovědi na intravenózní a perorální podání glukózy) (164). Jiná randomizovaná studie na dospělé populaci prokázala signifikantní zlepšení glykemie nalačno u pacientů, jimž byl v infuzi podáván GLP-1 (70). Výsledky studií cílených na postprandiální hodnotu glykemie také ukázaly, že při kombinaci infuze GLP-1/inzulín dochází k redukci postprandiální hyperglykemie než při podávání samotného inzulínu. Pravděpodobně je to způsobeno několika účinky GLP-1 (zvýšením senzitivity inzulínu, prodloužení doby evakuace žaludku a snížením sekrece glukagonu). Síla suprese je určena dávkou GLP-1 (165). I výsledky naší studie ukazují na vliv GLP-1 na kompenzaci onemocnění.

U našich pacientů se špatnou kompenzací onemocnění - T1DM⁺7 hladina GLP-1 negativně korelovala s HbA_{1c}% (p<0.05). Dále dle našich výsledků u T1DM GLP-1 pozitivně koreluje s PP a PYY (p<0.01, p<0.05). Shodně změny cirkulujících hladiny PP a PYY jsou popisovány u T1DM jedinců, ale přesný patofyziologický mechanismus vzájemného ovlivnění není prozatím znám. Nedávná studie také prokázala souvislost mezi GLP-1 a BMI (166). Také z našich výsledků plyne, že hladiny GLP-1 také korelují s hodnotou pacientova BMI (p<0.05). Můžeme se domnívat, že zvýšená hladina GLP-1 může fungovat jako pojistný mechanismus před dalším kalorickým příjmem a růstem BMI. Edwards a spol. popsali nižší kalorický příjem u zdravých jedinců, kterým byl podán inhibitor DPP-IV. DPP-IV inhibitory, které prodlužují biologický poločas GLP-1 a tím prodlužují jeho účinnost (167). Při podávání GLP-1/inzulín dochází 3x nižšímu riziku hypoglykemie a váhovému nárůstu v porovnání s aplikacemi samotného inzulinu.

GLP-1 se jeví jako perspektivný gastrointestinální peptid. Ovlivněním jeho metabolismus bychom mohli zlepšit kompenzaci onemocnění u dětských T1DM pacienty, i přestože řada aspektů biologických pochodů GLP-1 zůstává neznámá.

6.3 Ghrelin

Stále existuje jen omezené množství prací zabývajících se problematikou ghrelinu u dětských T1DM. Publikované studie porovnávající hladinu ghrelinu nalačno před zahájením léčby inzulinem prokázaly signifikantně nízké hodnoty ghrelinu u T1DM ve srovnání se zdravou populací. Hladiny se nelišily od zdravých jedinců již za několik dní po zahájení inzulínoterapie. Holdstock a spol. vyšetřovali hladiny ghrelinu u dětských T1DM po podání standardizovaného snídaňe po nočním lačnění. Zjistili, že hladiny ghrelinu jsou signifikantně nižší u T1DM pře zahájením léčby v porovnání se zdravou populací. Děti nadále sledovali a při identickém

testu po 9 měsících neodhalili žádné statisticky významné rozdíly v hladinách ghrelinu, když byly sniženy v porovnání se zdravou populací (97).

Naši probandi vykazovali nižší hladiny ghrelinu po podání pokrmu v porovnání s kontrolní skupinou ($p < 0.05$). Domníváme, že rozdílný výsledek v porovnání od předchozích studií je ovlivněn rozdílným trváním onemocnění. Skupina pacientů předchozí studie byla tvořena z nově diagnostikovaných T1DM jedinců. Je známo, že po zahájení inzulínoterapie dochází na určitou dobu k zlepšení funkce β -buněk pankreatu - tzv. „Honeymoon period“ (148). Hladina stimulovaného C-peptidu T1DM jedinců v naší studii byla $0,014 \pm 0,03$ nmol/l) potvrzující významnou depleci vlastního inzulínu. Ve srovnání s výsledky Holdstocka a spol., u jejichž pacientů byly očekávaně stanoveny nižší hladiny C-peptidu před zahájením léčby inzulínem než po 9 měsících léčby. Pravděpodobně v důsledku zmíněné zlepšené sekrece β -buněk při přechodné remisi onemocnění. Ghrelin dle našich výsledů nekoreluje s aktuální glykemií. U pacientů s T1DM⁺⁷ jsme pozorovali signifikantní tendenci k nižším hodnotám ghrelinu. Můžeme spekulovat, že při snaze vyrovnat špatnou kompenzaci onemocnění dochází u T1DM jedinců k supresi sekrece ghrelinu s cílem zvýšit senzitivitu periferních tkání vůči inzulínu a zlepšit sekreci inzulínu zbývajících β -buněk pankreatu.

Tuto hypotézu podporuje nejen signifikantně nižší hladiny ghrelinu ($p < 0.001$) u špatně kompenzovaných T1DM⁺⁷ jedinců, ale také zjištěná signifikantní negativní korelace mezi ghrelinem a dávkou inzulínu u T1DM jedinců. Identický trend jsme také pozorovali mezi vlastní tvorbou inzulínu a hladiny ghrelinu u zdravých jedinců ($p = 0.07$), což bylo také prokázáno na dospělé populaci (168). Tuto teorii dále podporuje negativní korelace mezi ghrelinem a HbA_{1c} ($p < 0.01$), jehož hladina společně s dávkou inzulínu a HDL funguje jako nezávislý prediktivní faktor pro hladinu ghrelinu. Naše výsledky ukazují, že hodnota ghrelinu by mohla přispět k hodnocení kompenzace T1DM u dětí.

U T1DM⁷ pacientů nalézáme normální hodnoty HDL (169). Hypoteticky, u jedinců s T1DM nebo T2DM nadměrné dávky inzulínu mohou hrát roli v akceleraci procesu aterosklerózy snížením hladin HDL (170). Nalezená pozitivní korelace mezi ghrelinem a HDL a negativní korelace mezi ghrelinem a triglyceridy ($p < 0.05$, $p < 0.01$) podporuje souvislost metabolismu ghreluinu a inzulínu, změny jejich hladin jsou spojeny vyšším rizikem rozvoje aterosklerózy.

6.4 Leptin

Nenalezli jsme statisticky významné rozdíly mezi zkoumanými skupinami jedinců v hladinách leptinu. I ve většině dalších studií, publikovaných ve světové literatuře, nebyly signifikantní rozdíly v hladinách leptinu (171; 172; 173). Na rozdíl od Kiese a spol., kteří popsali nízké hladiny leptinu u T1DM dětí před zahájením inzulínové léčby (170). Tyto hodnoty se však normalizovaly u prepubertálních nebo časně pubertálních T1DM pacientů léčené inzulínem. Naopak zvýšené hladiny leptinu byly zjištěny u postpubertálních (Tanner 5) dlouhodobě léčených T1DM jedinců ve srovnání s referenční skupinou. Předpokládáme, že rozdílné hodnoty hladin leptinu mohou být dány rozdílem v rozložení vyšetřované skupiny. Průměrný věk námi vyšetřované skupiny T1DM byl 13,38 (3,25) roku a nečítala dostatek jedinců k statistické analýze, pokud bychom pacienty rozdělili do skupin podle pubertálního statusu (dle Tannera). Hladina leptinu je závislá na pohlaví jedince. Dívky mají tendenci k vyšším hladinám leptinu (171). Shodně i v naší studii byly hladiny leptinu signifikantně vyšší u dívek než chlapů v obou vyšetřovaných skupinách (T1DM i zdravé kontroly). Na rozdíl od Solimana a spol. jsme nepozorovali korelaci mezi hladinou leptinu a kompenzací onemocnění ($HbA_{1c}\%$) (114). Naše výsledky se shodují s většinou publikovaných studií u dětských T1DM (104; 170; 172). Další studie porovnávající obézní a non-obézní T1DM, obézní jedince s non-obézními zdravými jedinci dospěla k závěru, že hladiny leptinu byly signifikantně vyšší u obézních T1DM ve srovnání s non-obézními T1DM, ale již se nelišily v porovnání s obézními

jedinci. A dokonce při redukci hmotnosti došlo i k poklesu hladiny leptinu (174). Tedy hladiny leptinu se u T1DM mění v závislosti na energetické bilanci shodně se zdravou populací. Jedním ze známých vedlejších účinků inzulinoaterapie je nárůst tělesné hmotnosti (BMI), což je spojeno s nárůstem hladiny leptinu. Ve skupině u našich T1DM také leptin koreloval s BMI ($p < 0.05$) shodující se i s dalšími studii (171; 172; 173). Podávání inzulínu indukuje syntézu leptinu.

To podporuje i náš nález pozitivní korelace mezi leptin a inzulínem ($p < 0.05$). Domníváme se, že inzulín hraje roli v metabolismu leptinu, nikoliv leptin v vlastním T1DM onemocněním. Můžeme spekulovat, proč u postpubertálních T1DM byly popsány vyšší hladiny leptinu. Po vlivem opakovaných aplikací inzulínu může během puberty docházet ke změně procentuálního zastoupení jednotlivých složek těla, s tendencí většího zastoupení lipidů. Je otázkou, zda vysoké hladiny leptinu jsou ovlivněny pubertálními změnami jedince, který je často vystaven potřebě vyšších dávek inzulínu. Uvažuje se, že vysoká hladina leptinu snižuje senzitivitu periferních tkání k inzulínu (175). Chrání vyšší hladiny leptinu snížením senzitivity periferních tkání k inzulínu organismus před dalšími hmotnostními přírůstky? V současné době není patofyziologický vyšších hladin leptinu u postpubertálních T1DM pochod znám.

6.5 Pankreatický polypeptid

Ve světové literatuře data týkající se pankreatického polypeptidu a dětského T1DM jsou sporá nebo zcela chybějí. Skupina námi vyšetřovaných T1DM jedinců měla hladiny PP mírně zvýšené oproti kontrolní skupině dětí, nikoliv však statisticky významné. Tato tendence je ještě více patrná ve skupině špatně kompenzovaných jedinců T1DM⁺⁷ v porovnání se zdravými kontrolami. Tsuda a spol. popsali signifikantně zvýšené hladiny PP u dospělých T1DM nalačno i po perorální podání glukózy (133). Po podávání PP pacientům s chronickou pankreatiti-

dou došlo signifikantnímu poklesu glykemie, ale stále přetrvávaly elevované v porovnání se zdravou populací (131).

Předpokládáme, že u T1DM k elevaci PP dochází ve snaze kontra-regulovat poruchu glukózového metabolismus. Elevované hladiny PP zvýší senzitivitu jaterní buňky k inzulinu a tím snížit množství glukózy produkované játry (124; 130). K nálezu elevovaných hladin PP přispívá i popsaná hyperplazie PP buněk pankreatu T1DM (176). Snaha organismu vyrovnat exkurze glykemie vyšší produkcí PP a nižší potřebou inzulinu. Tento vztah také podporují naše výsledky, ze kterých vyplývá signifikantní negativní korelace mezi hladinou PP a inzulinem ($p < 0.05$).

Domníváme se, že změny v hladinách PP u T1DM u dospělých i dětských pacientů ukazují, že PP pravděpodobně hraje důležitou úlohu v patofyziologii T1DM. Otázkou zůstává možnost jeho užití v klinické praxi. Výsledky vědeckých prací naznačují, že aplikace PP společně s inzulinem by mohla přispět k zlepšení kompenzace T1DM onemocnění.

6.6 PYY

Doposud nebyla role PYY u dětských T1DM výrazně studována. Ve shodě s dalšími studii provedených na zvířecích modelech jsme nenalezli signifikantní rozdíly mezi hladinami PYY u studovaných skupin. Pozorovali jsme však tendenci nižším hodnot PYY u T1DM v porovnání zdravými dětmi. Tato tendenci byla více zřejmá ve skupině špatně kompenzovaných jedinců T1DM⁺⁷ v porovnání se zdravými kontrolami. Žádné rozdíly nebyly však statisticky významné. Jelikož PYY inhibuje vyprazdňování žaludku, je postupně snižován počet L buněk, a tím i klesá syntéza PYY jako kontraregulační mechanismus zpomaleného vyprazdňování při hyperglykemii v důsledku T1DM (141). K jiným závěrům dospěli autoři hodnotící množství L buněk v rektu T1DM pacientů s dlouhodobým trváním T1DM (trvání nemoci

rozmezí: 18-48let) již s rozvinutými gastrointestinální komplikacemi onemocnění (nauzea, průjmy) (177). Na rozdíl od zvířecích studií u těchto pacientů byly nalezeny signifikantně početnější populace L buněk než u zdravých jedinců. Výsledky naznačují, že dochází ke změně počtu L buněk a hladiny PYY v závislosti na délce trvání onemocnění a inzulínové terapii nebo metabolismus PYY je zcela odlišný u lidských jedinců. Je třeba dalších studií k ověření těchto metabolických pochodů. Pro další poznání metabolismu PYY u T1DM bude třeba v budoucnu zhodnotit hladiny PYY a počet L-buněk různých časových etapách T1DM onemocnění, zaměřit se na hladiny PYY s souvislostí s poruchou motility jakožto GIT komplikací T1DM.

6.7 Funkční bolesti břicha a GIT hormony

RAP patří mezi nejčastější obtíže v dětském věku a jsou nejčastějším důvodem návštěvy ordinace dětského gastroenterologa. Dle epidemiologických studií RAP postihuje mezi 10-20% dětí školního věku s mírným nárůstem u ženského pohlaví po 9. roku věku (178). Mezi jednu z podskupin RAP patří FBB (179). V současnosti není příčina FBB známa, předpokládá se, že je založena na složitém biopsychosociálním modelu. V současné době existuje několik hypotéz: (1) nestabilita autonomního nervového systému, (2) viscerální hyperalgezií, (3) stresové situace nebo (4) GIT dysmotilitě (180; 181; 182; 183). Gastrointestinální trakt a nervový systém se vyvíjí ze stejného embryonálního základu. Neuropeptidy a neurotransmitéry produkované GIT ovlivňují GIT motilitu, prokrvení, sekreci a absorpci (184; 185). Předpokládá se, že chronické symptomy jsou následkem změn v ose mozek – GIT, kdy psychoemocionální stav jedince může vyústit v gastrointestinální dysfunkci (184). Některé z námi vyšetřovaných GIT hormonů ovlivňují motilitu GIT (amylin, GIP, GLP-1, PYY). Ve světové literatuře pouze

Nishozava *et al.* popsal zvýšené hladiny ghrelinu u dospělých pacientů s FD především s dysmotility like FD, avšak jednalo se jinou podskupinu RAP (186). V našem souboru FBB pacientů statistická analýza hladin GIT hormonů u souboru jedinců s FBB neukázala signifikantní rozdíly v jejich hladinách v porovnání se zdravými kontrolami. Na základě těchto dat můžeme předpokládat, že hladiny GIT hormonů pravděpodobně nehrají podstatnou roli v patofyziologických mechanismech FBB u dětí. Naše výsledky hladin GIT hormonů u dětí s FBB a zdravých kontrol ukazují, že metabolismus T1DM hraje důležitou roli v sekreci GIT peptidů uplatňující se s velkou pravděpodobností v patofyziologických mechanismech u T1DM.

7 Závěry

1. Všechny hormony byly stanoveny pomocí multiplexové metody (LINCOp[®]). Stanovení hladin pomocí multiplexové metody xMAP se jeví jako velmi výhodné především v pediatrii. Nejen pro efektivitu a senzitivitu metody, ale také vzhledem k potřebě minimálního objemu plazmy. Při analýze objem 25 μ l umožňuje stanovit i několik desítek analytů současně. To umožní redukovat potřebu mnoha imunologických kitů, zkrátí čas zpracování a v neposlední řadě cenu.
2. Stanovili jsme hladiny amylinu, ghrelinu, GIP, GLP-1, leptinu, inzulínu, PP a PYY u T1DM, zdravých kontrol a FBB.
3. Změny hladiny amylinu ($p < 0.001$), ghrelinu ($p < 0.05$) a GIP ($p < 0.01$) v porovnání s kontrolami prokazují alterovanou sekreci u T1DM dětských pacientů.
 - a. U skupiny T1DM s špatnou kompenzací jsme našli vysoce signifikantní odchylky v hladinách GIT hormonů. Ghrelin ($p < 0.001$) i GIP ($p < 0.01$) byly signifikantně odlišné od kontrolní skupiny.
 - b. Stanovili jsme plazmatické hladiny amylinu, ghrelinu, GIP, GLP-1, leptinu, inzulínu, PP a PYY u FBB pacientů, kteří tvořili 2. kontrolní soubor. Naše výsledky hladin GIT hormonů u dětí s FBB a zdravých kontrol ukazují, že metabolismus T1DM hraje důležitou roli v sekreci GIT peptidů uplatňující se s velkou pravděpodobností v patofyziologických mechanismech u T1DM.
4. Ve studii byl potvrzen vliv hormonů na kompenzaci T1DM.

- a. Nalezli jsme signifikantní korelace hodnot HbA_{1c} a dávky inzulínu s hladinou ghrelinu ($p < 0.01$) u T1DM. Tento vztah potvrzuje signifikantně nízká hladina ghrelinu u skupiny T1DM s špatnou kompenzací v porovnání se zdravou skupinou ($p < 0.001$).
 - b. Multivariatní regresní analýza potvrdila hodnotu HbA_{1c} a dávku inzulínu jako nezávislé faktory pro hladiny ghrelinu. Naše výsledky ukazují, že hodnota ghrelinu by mohla přispět k hodnocení kompenzace T1DM u dětí.
 - c. U dětských T1DM byl potvrzen signifikantní deficit plazmatické hladiny amylinu. U skupiny se špatnou kompenzací T1DM jsme našli signifikantní korelaci HbA_{1c} a hladiny amylinu ($p < 0.01$). Zařazení známého analoga do léčebného schématu T1DM studii by mohlo přispět k zlepšení metabolické kontroly a kompenzace T1DM, což prozatím bylo potvrzeno na dospělé populaci.
5. GIT hormony ukazují velký potenciál, jenž v budoucnu umožňují hlubší pochopení patofyziologických dějů T1DM dětí. Pokud se podaří farmakologicky zasáhnout do metabolických pochodů GIT hormonů, pravděpodobně se nám podaří zlepšit i metabolickou kontrolu a snížit morbiditu pacientů s T1DM.

8 Souhrn

Cílem bylo studovat vybrané GIT hormonů a hormonů související s metabolismem glukózy. Pomocí multiplexového kitu (LINCOpnex[®]) jsme stanovili hladiny hladinu amylinu, aktivního ghrelinu, aktivního GLP-1, GIP, inzulínu, leptinu, PP a PYY. Hladiny stanovených GIT hormonů byly korelovány s plazmatickými hladinami GIT hormonů kontrolních skupin a s antropometrickými a biochemickými parametry. Celkem bylo analyzováno 440 hladin vybraných GIT hormonů u 55 jedinců. Vyšetřovaný soubor tvořilo 19 T1DM pacientů (průměrný věk: 13,4 roků), 21 jedinců kontrolní skupiny (průměrný věk: 13,4 roku) a 15 dětí sledovaných pro FBB (průměrný věk: 10,5 roku). Vstupní data byla hodnocena pomocí Wilcoxonova párového testu, závislosti mezi hladinami jednotlivých hormonů v obou skupinách byly testovány pomocí Spearmanova a Kendallova koeficientu pořadové korelace, taktéž závislost mezi hladinou hormonů a biochemickými parametry. Následně signifikantní korelace byly podrobeny step-wise regresní analýze k odhalení možných nezávislých faktorů.

Studie prokázala, že stanovení hladin GIT hormonů použitím multiplexové metody se jeví jako velmi výhodné pro senzitivitu a efektivitu. Potřeba minimálního objemu plazmy (25 μ l) k analýze umožňuje stanovit i několik desítek analytů najednou, což je prospěšné především v pediatrii.

U skupiny T1DM pacientů byly nalezeny signifikantně nižší hladiny amylinu ($p < 0.001$), ghrelinu ($p < 0.05$) a C-peptidu ($p < 0.001$), naopak hladina GIP ($p < 0.05$) byla elevována v porovnání se zdravou populací. U skupiny T1DM s špatnou kompenzací byly zjištěny vysoce významné odchylky v hladinách GIT hormonů. Ghrelin ($p < 0.001$) i GIP ($p < 0.01$) byly signifikantně odlišné od kontrolní skupiny. Hladiny ostatní sledovaných hormonů se statisticky nelišily v porovnání s kontrolní skupinou.

Dále byly stanoveny hladiny amylinu, ghrelinu, GIP, GLP-1, leptinu, inzulínu, PP a PYY u FBB pacientů, kteří tvořili 2. kontrolní soubor. Hladiny hormonů dětí s FBB se signifikantně nelišily od zdravých kontrol. Naše výsledky hladin GIT hormonů dětí s FBB a zdravých kontrol ukázaly, že metabolismus T1DM hraje důležitou roli v sekreci GIT peptidů uplatňující se s velkou pravděpodobností v patofyziologických mechanismech u T1DM.

Ve studii byl potvrzen vliv hormonů na kompenzaci T1DM. Byly nalezeny signifikantní korelace hodnoty HbA_{1c} a dávkou inzulínu s hladinou ghrelinu. Tento vztah potvrzuje signifikantně nízká hladina ghrelinu u skupiny T1DM s špatnou kompenzací v porovnání se zdravou skupinou ($p < 0.001$). Multivariatní regresní analýza potvrdila hodnotu HbA_{1c} a dávku inzulínu jako nezávislé faktory pro hladiny ghrelinu ($p < 0.01$). Naše výsledky ukázaly, že hodnota ghrelinu by mohla přispět k hodnocení kompenzace T1DM u dětí.

Prokázané nízké hladiny amylinu u dětských T1DM potvrzují jeho deficit. U skupiny se špatnou kompenzací T1DM byla nalezena signifikantní korelace HbA_{1c} a hladiny amylinu ($p < 0.01$). Zařazení známého analoga amylinu do léčebného schématu T1DM studii by mohlo přispět k zlepšení metabolické kontroly a kompenzace T1DM, což prozatím bylo potvrzeno pouze na dospělé populaci. Tato studie může sloužit jako výchozí bod pro další studie u T1DM v dětském věku.

Výsledky prokázaly alterovanou sekreci vybraných GIT hormonů a hormonů souvisejících s metabolismem glukózy u dětských T1DM a také jejich vliv na denní potřebu inzulínu a metabolickou kontrolu nemoci. Průkaz odlišné sekrece GIT hormonů potvrdil, že inzulín není jediným hormonem, k jehož depleci dochází při autoimunitní destrukci pankreatických β -buněk pankreatu. GIT hormony ukazují velký potenciál, jenž v budoucnu umožňují hlubší pochopení patofyziologických dějů T1DM dětí. Pokud se podaří farmakologicky zasáhnout do metabolických pochodů GIT hormonů, pravděpodobně se nám podaří zlepšit i metabolickou kontrolu a snížit morbiditu pacientů s T1DM.

9 Summary

Our objective was to evaluate plasma levels of gut hormones and hormones associated with glucose metabolism in children with type 1 diabetes mellitus (T1DM), and to correlate plasma concentrations of gut hormones with blood biochemistry, markers of metabolic control and anthropometric parameters. A multiplex assay kit (LINCOplex[®]) was used for the determination of postprandial plasma levels of specific gut peptide hormones. Amylin, glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP), active glucagon-like peptide 1 (GLP-1), active ghrelin, insulin, leptin, pancreatic polypeptide (PP), and polypeptide YY (PYY) were assessed prospectively in 55 subjects including 19 T1DM children (mean age: 13.4 years) and 21 healthy reference controls (mean age: 13.4 years) and 15 patients with functional abdominal pain (FAP) (mean age: 10.5 years). In total, 440 plasma hormone samples were assessed in 55 patients. Entered data were examined using a non-parametric Wilcoxon's test. Furthermore, statistically significant correlations were assessed by stepwise regression analysis.

Our study demonstrated that the determination of specific postprandial gut hormones with the multiplex assay kit (LINCOplex[®]) was highly efficient. Not only was a small amount of plasma sample (25µl) required for analysis, but also a vast number of gut hormones could be assessed simultaneously. This is particularly useful in paediatrics.

T1DM subjects demonstrated significantly reduced amylin ($p < 0.001$) and ghrelin ($p < 0.05$) levels, whereas GIP ($p < 0.05$) was elevated when compared to healthy controls. Hormone levels may impact on daily insulin dosages as well as metabolic control. Differences in gut hormones levels in T1DM with worse metabolic control tended to be more significant in comparison to healthy controls. Plasma levels of ghrelin ($p < 0.001$) and GIP ($p < 0.01$) were more significantly different in T1DM with worse metabolic control. Plasma levels of other assessed hormones did not differ significantly.

The FAP group of patients was considered as a second reference group. No statistically significant differences were found in hormone plasma levels between FAP patients and healthy controls. This implies an important role of gut peptides in T1DM children.

Based on our results, gut hormones may have an impact on T1DM metabolic control. A significant correlation between HbA_{1c}, daily insulin dosage and ghrelin was found in T1DM. This supports a significant correlation between HbA_{1c}, daily insulin dosage and ghrelin in T1DM with worse metabolic control. Step-wise regression analysis confirmed HbA_{1c} and daily insulin dosage as a predictive factor for ghrelin plasma levels. Based on our findings we could further speculate that postprandial ghrelin values might serve as a measurable parameter of metabolic control.

Our study demonstrated altered secretion patterns of GIT hormones in T1DM children. This supports the theory that insulin is not the only hormone which is lost after β -cells destruction or its secretion altered. A potential use of amylin to reduce postprandial hyperglycaemia can be envisioned as its deficit in T1DM and significant correlation with HbA_{1c} were demonstrated. Studies utilising GIT hormones are a promising future prospect for a deeper understanding of diabetic metabolism. Given our final data one might speculate that better metabolic control and lower morbidity could be achieved using pharmacological intervention in GIT hormone pathways.

10 Literatura

1. **Raha O, Chowdhury S, Dasgupta S et al.** Approaches in type 1 diabetes research: A status report. *Int J Diabetes Dev Ctries.* 2009 , 29(2):85-101.
2. **Casares S, Brumeanu TD.** Insights into the pathogenesis of T1DM: A hint for novel immunospecific therapies. *Curr Molec Med .* 2001, 1:357–378.
3. **Chen C, Lee WH, Yun P et al.** Induction of autoantigen-specific Th2 and Tr1 regulatory T cells and modulation of autoimmune diabetes. *J Immunol.* 2003, 171(2):733-44.
4. **Thomas HE, Trapani JA, Kay TW.** The role of perforin and granzymes in diabetes. *Cell Death & Differentiation .* 2010, 17, 577-585.
5. **Atkinson MA, Eisenbarth GS.** Type 1 diabetes: New perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet.* 2001, 358: 221–229.
6. **Pietropaola M, Peakmana M, Pietropaolo SL.** Combined Analysis of GAD65 and ICA512(IA-2) Autoantibodies in Organ and Non-organ-specific Autoimmune Diseases Confers High Specificity for Insulin-dependent Diabetes Mellitus. *Journal of Autoimmunity.* 1998, 11(1) 1-10 .
7. **Lebl J, Průhová Š. .** *Monogenní diabetes mellitus. Od diagnostiky k léčbě.* Praha 2009 : Maxdorf, 2009.
8. **Varvarovská J, Siala K, Pomahacova R, Sykora et. al.** Mastering the treatment of Diabetes Mellitus Type 1 in Childhood and Adolescence. *Current Pediatric Reviews.* 2007, 5.
9. **American Diabetes, Association.** Standards of medical care in diabetes -- 2009. *Diabetes Care.* 2009, 32:13-61.
10. **Jacobson AM, Musen G, Ryan CM, Silvers N, Cleary P,.** Long-term effect of diabetes and its treatment on cognitive function. *N Engl J Med.* 2007, 5, 356:1842-52.
11. **Lernmark L.** Type I diabetes. *Clinical Chemistry.* 1999, 45:1331-1338.
12. **McAulay V, Frier BM.** Addison's disease in type 1 diabetes presenting with recurrent hypoglycaemia. *Postgrad Med J.* 2000, 76: 230-2.

13. **Schuppan D.** Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology*. 2000, 119: 234-242.
14. **Mahmud FH, Murray JA, Kudva YC,.** Celiac disease in type 1 diabetes mellitus in a North American community: prevalence, serologic screening, and clinical features. *Mayo Clin Proc*. 2005, 80(11):1429-34.
15. **Mäki M, Mustalahti K, Kokonen J.** Prevalence of Celiac disease among Children in Finland. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2000, 33 (4): 462-465.
16. **Atkay AN, Lee P.C., Kumar V et al.** The Prevalence and Clinical Characteristics of Celiac Disease in Juvenile Diabetes in Wisconsin. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*:. 2001, 33(4):462-465.
17. **Sarah JS, Brunzell C.** Type 1 Diabetes and Celiac Disease: Overview and Medical Nutrition Therapy. *Diabetes Spectrum* . 2002, 15(3): 197-201 .
18. **Mohn A, Cerruto M, Lafusco D et al.** Celiac disease in children and adolescents with type I diabetes: importance of hypoglycemia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 32:37–40. 2001, 32:37–40.
19. **Acerini CL, Ahmed ML, Ross KM et al.** Coeliac disease in children and adolescents with IDDM: clinical characteristics and response to gluten-free diet. *Diabet Med*. 1998, 15:38–44.
20. **Kaukinen K, Salmi J, Lahtela J et al.** No effect of gluten-free diet on the metabolic control of type 1 diabetes in patients with diabetes and celiac disease: retrospective and controlled prospective survey. *Diabetic care* . 1999, 22:1747-1748.
21. **Calvet HM, Yoshikawa TT.** Infections in diabetes. *Infect Dis Clin*. 2001, 15:407-21.
22. **Geerlings SE, Hoepelman A et al.** FEMS Immunol Med Microbiol . 1999. 26: 259.
23. **Sýkora J, Malán A, Záhlava J.** Gastric Emptying of Solids in Children with H. pylori-Positive and H. pylori-Negative Non-Ulcer Dyspepsia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004, 39:246-252.
24. **Gasbarrini A, Franceschi F.** Autoimmune disease and Helicobacter pylori infection. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1999, 53(5-6):223-226.

25. **Diabetes, Helicobacter pylori and Type 1.** Cacciari E, Menegatti M, Landi F. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999, 28(3):307-9.
26. **Gallacher S, Thomson G, Fraser WD et al.** Neutrophil bactericidal function in diabetes mellitus: Evidence for association with blood glucose control. *Diabetic Med.* 1995, 12:916.
27. **Begue RE, Gomez R, Compton T, et al.** Effect of Helicobacter pylori eradication in the glykemia of children with type 1 diabetes. *South Med J.* 2002, 95:842-5.
28. **Candelli M, Rigante D.** Helicobacter pylori Eradication Rate and Glycemic Control in Young Patient With Type 1 Diabetes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004, 38:422-425.
29. **Gasbarrini A, Ojetti V, Pitocco D, et al.** Insulin-dependent diabetes mellitus affects eradication rate of Helicobacter pylori infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1999, 11:713-716.
30. **Sýkora J., Pomahačová R., Siala K., Huml M. et al.** H. pylori Infection in Children and Adolescent with Type 1 Diabetes Mellitus, Helicobacter 2008, 13: 392-479. *Helicobacter.* 2008, 13: 392-479.
31. **Huml M, Sýkora J, Pomahačová R.** Helicobakter pylori a Diabetes mellitus typ 1 v dětském věku. *Čes. - slov. Pediat.* 2008, 63(7-8):444-445.
32. **Trotta D, Verrotti A, Salladini et al.** Diabetic neuropathy in children and adolescents. *Pediatr Diabetes.* 2004, 5(1):44-57.
33. **Aaron IV, Raelene E, Braxton D et al.** Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes care.* 2003, 26:1553-1579.
34. **Park MI, Camilleri M.** Gastroparesis: Clinical Update. *Am J Gastroenterol.* 2006, 101:1129-1139.
35. **Camilleri M, Malagelaga JR.** Abnormal intestinal motility in diabetics with the gastroparesis syndrome. *Eur J Clin Invest.* 1984, 14(6):420-7.
36. **Luiking YC, Van der Reijden AC, van Berge Henegouwen GP et al.** Migrating motor complex cycle duration is determined by gastric or duodenal origin of phase III. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1998, 275(6):1246-1251.

37. **Cryer PE.** Diverse Causes of Hypoglycemia-Associated Autonomic failure in Diabetes. *N Eng J Med.* 2004, 350:2272-9.
38. **Reid B, Di Lorenzo C, Travis L et al.** Diabetic gastroparesis due to postprandial antral hypomotility in childhood. *Pediatrics* . 1992, 90:43–46.
39. **White NH, Waltman SR, Krupin T et al.** Reversal of neuropathic and gastrointestinal complications related to diabetes mellitus in adolescents with improved metabolic control . *J Pediatr* . 1981, 99:41–45.
40. **Cucchiara S, Franzese A, Salvia G et al.** Gastric emptying delay and gastric electrical derangement in IDDM. *Diabetes Care.* 21:(3) 438-443., 1998, 21:(3) 438-443.
41. **Jeha GS, Heptulla RA.** Newer therapeutic options for children with diabetes mellitus: theoretical and practical considerations. *Pediatric Diabetes.* 7 (5), 299-299, 2006.
42. **Hanabusa T, Kubo K, Oki C et al.** Islet amyloid polypeptide secretion islet cells and its plasma concentration in patient diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 1992, 15:89-96.
43. **Mosselman S, Hopperner JW, Zandberg J et al.** Islet amyloid polypeptide: identification and chromosomal localization of the human gene. *FEBS Lett.* 1988, 239:227-232.
44. **Sanke T, Bell GI, Sample C et al.** An islet amyloid peptide is derived from an 89-amino acid precursor by proteolytic processing. *J Biol Chem* 1988; 263: 17243–17246. *J Biol Chem.* 1988, 263: 17243–17246.
45. **Roberts AN, Leighton B, Todd JA.** 1. Molecular and functional characterization of amylin, a peptide associated with type 2 diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989, 86: 9662–9666.
46. **Knowles NG, Landchild MA, Fujimoto WY et al.** SE. Insulin and amylin release are both diminished in first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes. *Diabetic Care.* 2002, 25: 292–297.
47. **Badman MK, Shennan KI, Jermany JL et al.** Processing of pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) by the prohormone convertase PC2. *FEBS Lett.* 1996, 378: 227–231.

48. **Leckstrom A, Bjorlung K, Permert J. et al.,** Renal elimination of islet amyloid polypeptide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997, 239: 265–268.
49. **Novials A, Sarri Y, Casamitjana R et al. R.** Regulation of islet amyloid polypeptide in human pancreatic islets. *Diabetes.* 1993, 42:1514–1519.
50. **Orslov L, Nyholm B, Yde HK et al.** Effects of the amylin analogue pramlintide on hepatic glucagon responses and intermediary. *Diabet med.* 1999, 16: 867–874.
51. **Kong MF, King P, Macdonald IA.** Infusion of pramlintide, a human amylin analogue, delays gastric emptying in men with IDDM. *Diabetologia.* 1997, 40:82-88.
52. **Panagiotidis G, Salehi AA, Westermark P et al.** Homologous islet amyloid polypeptide: effects on plasma levels of glucagon, insulin and glucose in the mouse. *Diabetes Res Clin Pract.* 1992, 18:167-171.
53. **Gebulin BR, Young AA.** Hypoglycemia overrides amylin-mediated regulation of gastric emptying in rats. *Diabetes.* 1998, 47:93–97.
54. **Lutz TA, Senn M, Althaus J et al.** Lesion of the area postrema/nucleus of the solitary tract (AP/NTS) attenuates the anorectic effects of amylin and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in rats. *Peptides.* 1998, 19:309–317.
55. **Rushing PA, Hagan MM, Seeley RJ et al.** Inhibition of central amylin signaling increases food intake and body adiposity in rats. *Endocrinology* 2001; 142: 5035. 2001, 142: 5035.
56. **Ratner RE, Dickey R, Fineman M et al.** Amylin replacement with pramlintide as an adjunct to insulin therapy improves long-term glycaemic and weight control in type 1 diabetes mellitus: a 1-year, randomized controlled trial. *Diabet Med.* 2004, 21:1201-4.
57. **Whitehouse F, Kruger DF, Fineman M et al.** A randomized study and open-label extension evaluating the long-term efficacy of pramlintide as an adjunct to insulin therapy in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2002, 25: 724–730.
58. **Hassan K, Heptulla RA.** Reducing postprandial hyperglycemia with adjuvant premeal pramlintide and postmeal insulin in children with type 1 diabetes mellitus. *Pediatric Diabetes* 2009; 10:264 – 268. *Pediatric Diabetes.* 2009, 10:264 – 268.

59. **Moore B, Edie ES, Abram JH.** On the treatment of diabetes mellitus by acid extract of duodenal mucous membrane. *Biochem J.* 1906, 1:28-38.
60. **Ranganath L, Sedgwick I, Morgan L et al.** The ageing entero-insular axis. *Diabetologia.* 1998, 41:309–13.
61. **Macdonald IA, Nauck MA, Kong MF.** Impact of gastrointestinal function on glycaemic control . [autor knihy] Samson M Horowitz M. *Gastrointestinal function in Diabetes mellitus.* London : John Wiley & son, 2004.
62. **Doyle ME, Egan JM.** Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol Ther.* 2007, 113: 546–593.
63. **Bell GI, Santerre RF, Mullenbach GT.** Hamster preproglucagon contains the sequence of glukagon and two related peptides. *Nature.* 1983, 302:716-718.
64. **Kieffer TJ, McIntosh CH, Pederson RA.** Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology.* 1995, 136:3585-3596.
65. **Hupe S, Goke R, Goke B et al.** Endoproteolysis of glucagon-like peptide (GLP)-1(7–36) amide by ectopeptidases in RINm5F cells. *Peptides.* 1997, 18:625-632.
66. **Greenbaum CJ, Prigeon RL, D’Alessio DA et al.** Impaired β -Cell Function, Incretin Effect, and Glucagon Suppression in Patients With Type 1 Diabetes Who Have Normal Fasting Glucose. *Diabetes.* 2002, 51:951-957.
67. **Dupra J.** Glycaemic effects of incretins in Type 1 diabetes mellitus: a concise review, with emphasis on studies in humans. *Regul Pept.* 2005, 128:149-57.
68. **Myhre J, Wetergren CH, Schjoldager B et al.** Truncated GLP-1 inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Dig Dis Sci.* 1993, 38:665-673.
69. **Willms b, Werner J, Holst JJ et al.** Gastric emptying glucose responses and insulin secretion after a liquid test meal: effect of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (7-36) amide in type 2 (non-insulin-dependent). *J Clin Endocrinol Metab.* 1996, 81:327-332.

70. **Creutzfeldt W, Kleine N, Willms B et al.** Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide (7-36) amide in type I diabetic patients. *Diabetic Care*. 1996, 19:580-586.
71. **Gutniak M, Orskov C, Holst JJ et al.** Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1992, 326:1316-1322.
72. **Behme MT, Dupre J, McDonald TJ et al.** Glucagon-like peptide 1 improved glycemic control in type 1 diabetes. *BMC Endocr Disord*. 2003, 3:3.
73. **Johnson TJ, Reus BE, Culpepper AL et al.** Detection of a length polymorphism for human GIP gene by polymerase chain reaction. *Nucl Acids Res*. 1991, 19:4312.
74. **Dupre J, Ross SA, Watson D.** Stimulation of glucagon secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *J Clin Endocrinol Metab* . 1973, 37:826-838.
75. **Elliot RM, Morgan LM, Tredger JA et al.** Glucagon like peptide (7-36) amide and glucose dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J Endocrinol*. 1993, 139:159-166.
76. **Pederson RA, Schubert HE, Brown JC.** Gastric inhibitory polypeptide. Its physiologic release and insulinotropic action in the dog. *Diabetes*. 1975, 24:1050-1056.
77. **Ross SA, Dupre J.** Effects of ingestion of triglyceride or galactose to intravenous glucose in normal and diabetic subjects. 1978. *Diabetes* , 27:327-333.
78. **Lynn FC, Nathalie P, Eddy HC et al.** Defective glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor expression in diabetic fatty Zucker rats. *Diabetes*. 2001, 50:1004-1011.
79. **Zhou J, Livak MF, Bernier M. et al.** Ubiquitination is involved in glucose-mediated downregulation of GIP receptors in islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007, 293:538-547.
80. **Krarup T, Madsbad S, Moody AJ et al.** Gastric inhibitory polypeptide in newly diagnosed ketotic type I (insulin-dependent) diabetics. *Acta Med Scand*. 1988;223:437-41. *Acta Med Scand*. 1988, 223:437-41.

81. **Nakanome C, Akai H, Umezu M, Toyota T et al.** Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP) Response to an oral Glukose Load in the Pacients with Diabetes Mellitus. *Tohoku J. exp. Med.* 1983, 139:287-292.
82. **Hiroyuki A, Ariyasu H, Takaya K et al.** Stomach is major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, 86(10) 4753-4758.
83. **Date Y, Kojima M, Hosoda H et al.** Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology.* 2000, 141:4255–4261.
84. **Korbonits M, Bustin SA, Kojima M et al.** The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, 86:881–887.
85. **Rindi G, Torsello A, Locatelli V et al.** Ghrelin Expression and Actions: A Novel Peptide for an Old Cell Type of the Diffuse Endocrine System. *Exp Biol Med.* 2004, 229:1007-1016.
86. **Howard AD, Feighner SD, Cully DF et al.** A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science.* 1996, 273:974–977.
87. **Cheng K, Chan WW, Barreto A.** The synergistic effects of His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ on growth hormone (GH)-releasing factor-stimulated GH release and intracellular adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in rat primary pituitary cell culture. *Endocrinology.* 1989, 124:2191-2798.
88. **Hayashida T, Nakahara K, Mondal MS et al.** Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role. *J Endocrinol.* 2002, 173:239-245.
89. **Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS et al.** A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes.* 2001, 50:1714–1719.
90. **Yuxiang S, Asnicar M, Roy G. et al.** Central and Peripheral Roles of Ghrelin on Glucose Homeostasis. *Neuroendocrinology.* 2007, 86:215–228.
91. **Yada T, Dezaki K, Sone H et al.** Ghrelin Regulates Insulin Release and Glycemia: Physiological Role and Therapeutic Potential. *Current Diabetes Reviews.* 2008, 4:18-23.

92. **Broglia F, Gottero C, Prodam F et al.** Ghrelin secretion is inhibited by glucose load and insulin-induced hypoglycaemia but unaffected by glucagon and arginine in humans. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004, 61: 503–509.
93. **Lee HM, Wang G, Englander EW et al.** Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence. *Endocrinology* 2002; 143: 185–190. 2002, 143: 185–190.
94. **Celi F, Bini V, Papi et al.** Circulating acylated and total ghrelin and galanin in children with insulin-treated type 1 diabetes: relationship to insulin therapy, metabolic control and pubertal development. *Clin Endocrinol*. 2005, 63:139–145.
95. **Holdstock C, Ludvigsson J, Karlsson FA et al.** Abnormal ghrelin secretion in new onset childhood type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2004, 47: 150–151.
96. **Ranganathan S, Ciaraldi TP, Henry PP et al.** Lack of Effect of Leptin on Glucose Transport, Lipoprotein Lipase, and Insulin Action in Adipose and Muscle Cells. *Endocrinology*. 1998, 139:2509-13.
97. **Mix H, Widjabab A, Jandla O et al.** Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the human stomach. *Gut*. 2000, 47:481-486.
98. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M et al.** Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994, 372: 425-32.
99. **Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV et al.** Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization. *Biophysical research communications*. 1997, 232:383-387.
100. **Luoh S-M, Di Marco F, Levin N et al.** Cloning and characterization of a human leptin receptor using a biologically active leptin immunoadhesin. *Journal of Molecular Endocrinology*. 1997, 18: 77-85.
101. **Sinha MK, Caro JF.** Clinical aspects of leptin. *Vitam Horm*. 1998, 54:1-30.
102. **Considine RV, Sinha MK, Heiman ML et al.** Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Eng J Med*. 1996, 334: 292–295.

103. **Murakami T, Shima K et al.** Cloning of rat obese cDNA and its expression in obese rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 , 209: 944–952.
104. **Funahashi T, Shimomura I, Hiraoka H et al.** Enhanced expression of rat obese (ob) gene in adipose tissues of ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995, 211: 469–475.
105. **De Vos P, Saladin R, Auwerx J et al.** Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss. *The Journal of Biological Chemistry.* 1995, 270: 15958-15961.
106. **Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV et al.** Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro. *Diabetes.* 1996, 45: 5 699-701.
107. **Pérez C, Fernández-Galaz C, Fernández-Agulló T et al.** Leptin Impairs Insulin Signaling in Rat Adipocytes. *Diabetes .* 2004, 53:347-353.
108. **Ceddia RB, Lima FB, Carpinelli AR et al.** Pivotal role of leptin in insulin effects. *Braz J Med Biol Res.* 1998, 31: 715-722.
109. **Barr VA, Malide d, Zarnowski MJ.** Insulin Stimulates Both Leptin Secretion and Production by Rat White Adipose Tissue. *Endocrinology .* 1997, 138(10):4463-4472.
110. **Utriainen T, Malmström R, Mäkimattila S.** Supraphysiological hyperinsulinemia increases plasma leptin concentrations after 4 h in normal subjects. *Diabetes.* 1996, 45(10):1364–1366.
111. **Malmström R, Taskinen MR, Karonen SL et al.** Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia.* 1996, 39(8):993-6.
112. **Soliman AT, Omar M, Assem HM.** Serum leptin concentrations in children with type 1 diabetes mellitus: relationship to body mass index, insulin dose, and glycemic control. *Metabolism.* 2002, 51(3):292-6.
113. **Takeuchi T, Gumucio DL, Yamada T et al.** Genes encoding pancreatic polypeptide and neuropeptide Y are on human chromosomes 17 and 7. *J Clin Invest .* 1986, 77(3):1038-1041.

114. **Adrian TE, Bloom SR, Bryant MG et al.** Distribution and release of human pancreatic polypeptide. *Gut* 1976;17:940-944. *Gut* . 1976, 17:940-944.
115. **AU Eva C, Keinanen K, Monyer H et al.** 13 TI Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor that may belong to the neuropeptide receptor family. *R SO FEBS Lett* . 1990, 271(1-2):81-84.
116. **Rose PM, Fernandes P, Lynch JS et al.** Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. *J Biol Chem* . 1995, 270:29038.
117. **AU Lee CC, Miller RJ.** Is there really an NPY Y3 receptor? . 1998, 25:75-76,71-8.
118. **AU Bard JA, Walker MW, Branchek TA et al.** Cloning and functional expression of a human Y4 subtype receptor for pancreatic polypeptide, neuropeptide Y, and peptide YY. *J Biol Chem* . 1995, 10:26762-5. .
119. **Weinberg DH, Sirinathsinghji DJ, Tan CP at al.** Cloning and expression of a novel neuropeptide Y receptor. *J Biol Chem* . 1996, 271(28):16435-8.
120. **Bard JA, Walker MW, Branchek TA et al.** Cloning and fuctional expression of a human Y4 subtype receptor for pancreatic polypeptide, neuropeptide, and peptide YY. *J Biol Chem*. 1995, 270:26762-5.
121. **Hazelwood RL, Turner SD, Kimmel, JR et al.** Spectrum effects of a new polypeptide (Third Hormone?) isolated from the chicken pancreas. *Gen Comp Endocrinol*. 1973, 21:485-97.
122. **Polak, JM, Bloom SR, AdrianTE et al.** Pancreatic polypeptide in insulinomas, gastrinomas, VIPomas and glucagonomas. *Lancet*. 1976, 1:328-330.
123. **Hanukoglu A, Chalew S, Kowarski AA et al.** Human pancreatic polypeptide in children and young adults. *Horm Metab Res*. 1990, 22(1):41-3.
124. **Marco J, Zulueta MA, Correas I et al.** Reduced pancreatic polypeptide secretion in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* . 1980, 50:744–747.
125. **Lassmann V, Vague P, Vialettes B et al.** Low plasma levels of pancreatic polypeptide in obesity. *Diabetes*. 1980, 29:428–430.

126. **Uhe AM, Szmukler GI, Collier GR et al.** Potential regulators of feeding behavior in anorexia nervosa. *Clin Nutr* . 1992, 55:28–32.
127. **Asakawa A, Inui A, Yuzuriha H et al.** Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. *Gastroenterology*. 2003, 124(5):1325-1336.
128. **Kono T, Hanazaki K, Yazawa K et al.** Pancreatic Polypeptide Administration Reduces Insulin Requirements of Artificial Pancreas in pancreatectomized Dogs. *Artif Organs* . 2005, 29:83-87.
129. **Brunicaudi FC, Chaiken RL, Ryan AS.** Pancreatic Polypeptide Administration Improves Abnormal Glucose Metabolism in Patients with Chronic Pancreatitis. *J Clin Endocrinol Metab* . 1996, 81:3566-72.
130. **Adeghate E, Ponery A.** Pancreatic peptides, neuropeptides and neurotransmitters in diabetes. *Int J Diabetes & Metabolism* . 2003, 11:1-6.
131. **Tsuda K, Sakurai H, Seino Y et al.** . Abnormal pancreatic polypeptide response to oral glucose loading diabetes mellitus. *Clin Endocrinol* . 1980, 13:425-9.
132. **Greeley GHJ, Jeng YJ, Gomez G et al.** Evidence for regulation of peptide-YY release by the proximal gut. *Endocrinology*. 1989, 124: 1438–43.
133. **Bottcher G, Alumets J, Hakanson R et al.** Co-existence of glicentin and peptide YY in colorectal L-cells in cat and man. An electron microscope study. *Regul Pept* . 1986, 13:283–91.
134. **Grandt D, Schimiczek M, Beglinger C et al.** Two molecular forms of peptide YY (PYY) are abundant in human blood: characterization of a radioimmunoassay recognizing PYY 1–36 and PYY 3–36. *Regul Pept*. 1994, 51:151–9.
135. **Batterham RL, Bloom SR et al.** The gut hormone peptide YY regulates appetite. *Ann N Y Acad Sci*. 2003, 994:162-8.
136. **Keire DA, Bowers CW, Solomon TE et al.** Structure and receptor binding of PYY analogs. *Peptides* . 2003, 23:305-321.
137. **Grundemar L.** Multiple receptors and multiple actions. [autor knihy] Bloom SR. Grundemar L. *Neuropeptide Y and drug development*. San Diego : Academic Press, 1997.

138. **Batterham RL, Cowley MA, Small JS.** Gut hormone PYY3-36 physiologically inhibits food intake. *NATURE* . 2002, 418:650-654.
139. **Mannon P, Taylor I.** The pancreatic polypeptide family. [autor knihy] Dockray G, Walsh B. *Gut peptides. Biochemistry and physiology.* New York: Raven Press, 1994: pp351–8. New York : Raven Press, 1994.
140. **Spånge A, El-Salhy M.** Large intestinal endocrine cells in nonobese diabetic NOD-mice. *J Diabetes Comp* . 1998, 2:321–7.
141. **Good medical, council.** *Good medical practice.* London : General Medical Council, 2006.
142. **Hattersley A, Bruining J, Shield J et al.** ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2006-2007. The diagnosis and management of monogenic diabetes in children. *Pediatr Diabetes.* 2006 . 2006, 7(6):352-60.
143. **(ISPAD), International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes.** Consensus guidelines 2000: ISPAD consensus guidelines for the management of type 1 diabetes mellitus in children and adolescents. 2000, Available at: <http://www.diabetesguidelines.com>.
144. **Alemzadeh R, Wyatt DT.** Diabetes mellitus in children . [autor knihy] Klinedman RM, Jenson HB Berhmna RE. *Nelson textbook of peditrics* . Philidelphia : Elsevier, 2005.
145. **Drossman DA, Dumitrascu DL.** Rome III: New standard for functional gastrointestinal disorders. *J. Gastrointestin Liver Dis.* 2006, 15:237-41.
146. **Heinze E, Thon A.** Honeymoon period in insulin-dependent diabetes mellitus. *Pediatrician.* 1983, 12(4):208-12.
147. **Heptulla RA, Rodriguez LM, Bomgaars L.** The role of amylin and glucagon in the dampening of glycemic excursions in children with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005, 54(4):1100-7.
148. **Nyholm B, Orskov L, Hove KY et al.** The amylin analog pramlintide improves glycemic control and reduces postprandial glucagon concentrations inpatients with type 1 diabetes mellitus. *Metabolism* . 1999, 48: 935–941.

149. **Kolterman OG, Schwartz S, Corder C et al.** Effect of 14 days' subcutaneous administration of the human amylin analogue, pramlintide (AC137), on an intravenous insulin challenge and response to a standard liquid meal in patients with IDDM. *Diabetologia*. 1996, 9: 492–499.
150. **Thomson RG, Peterson J, Gottlieb A et al.** Effects of pramlintide, an analog of human amylin, on plasma glucose profile in patients with IDDM: results of a multicenter trial. *Diabetes* . 1997, 46: 632–636.
151. **Thomson RG, Pearson L, Kolterman OG et al.** Effects of 4 weeks' administration of pramlintide, a human amylin analogue, on glycaemia control in patients with IDDM: effects on plasma glucose profiles and serum fructosamine concentrations. *Diabetologia* . 1997, 40:1278–1285.
152. **Levetan C, Want LL, Weyer C et al.** Impact of pramlintide on glucose fluctuations and postprandial glucose, glucagon, and triglyceride excursions among patients with type 1 diabetes intensively treated with insulin pumps. *Diabetes Care* . 2003, 26:1–8.
153. **Weyer c, Gottlieb A, Kim DD et al.** Pramlintide reduces postprandial glucose excursions when added to regular insulin or insulin lispro in subjects with type 1 diabetes: a dose-timing study. *Diabetes Care* . 2003, 26: 3074–3079.
154. **Fineman MS, Koda JE, Shen LZ et al.** The human amylin analog, pramlintide, corrects postprandialhyperglucagonemia in patients with type 1 diabetes. *Metabolism* . 2002, 51: 636–641.
155. **Chase HP, Lutz K, Pencek R et al.** Pramlintide lowered glucose excursions and was well-tolerated in adolescents with type 1 diabetes: results from a randomized, single-blind, placebo-controlled, crossover study. *J Pediatr*. 2009, 155(3):369-73.
156. **Rodriguez LM, Mason KJ, Haymond MW et al.** The role of prandial pramlintide in the treatment of adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr Res*. 2007, 62(6):746-9.
157. **Kishiyama CM, Burdick PL, Cobry EC et al.** A Pilot Trial of Pramlintide Home Usage in Adolescents With Type 1 Diabetes. *Pediatrics* . 2009, 124 (5):1344-1347.
158. **Ratner RE, Dickey R, Fineman M, Maggs DG et al.** Amylin replacement with pramlintide as an adjunct to insulin therapy improves long-term glycaemic and weight control

in Type 1 diabetes mellitus: a 1-year, randomized controlled trial. *Diabet Med.* 2004, 21(11):1204-12.

159. **Eldeman S, Zhang B, Cars S et al.** A double-blind, placebo controlled trial assessing pram lintide treatment in the setting of intensive insulin therapy in type 1 diabetes. *Diabetes care.* 2006, 29(10):2189-2195.

160. **Krstrup T, Madsbad S, Moody AJ.** Immunoreactive gastric inhibitory polypeptide response to a meal during the first eighteen months after diagnosis of type 1 (insulin dependent.) diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* . 1985, 60:120-5.

161. **Couri CEB, Foss-Freitas MA, Foss MC et al.** β -cell regeneration to treat Type 1 diabetes mellitus. *Expet Rev Endocrinol Metabol* . 2008, 3:51-60.

162. **Carla J. Greenbaum, 1 Ronald L et al.** Impaired B-Cell Function, Incretin Effect, and Glucagon Suppression in patients With Type 1 Diabetes Who Have Normal Fasting Glucose. *Diabetes* . 2002, 51:951–957.

163. **Dupre J, Behme MT, Hramiak IM et al.** Glucagon-like peptide I reduces postprandial glycemic excursions in IDDM. *Diabetes* . 1995, 44: 626–630.

164. **De Luis D.A., Gonzalez Sagrado M., Conde R et al.** Decreased Basal Levels of Glucagon-Like Peptide-1 after Weight Loss in Obese Subjects. *Ann Nutr Metab* . 2007, 51:134-138.

165. **Edwards CM, Stanley SA, Davis R et al.** Exendin-4 reduces fasting and postprandial glucose and decreases energy intake in healthy volunteers. *Am J Physiol Endocrinol Metab* . 2001, 281:155–161.

166. **Martos-Moreno GA, Barrios V, Soriano-Guillen L et al.** Relationship between adiponectin levels, acylated ghrelin levels, and short-term body mass index changes in children with diabetesmellitus type 1 at diagnosis and after insulin treatment. *Eur J Endocrinol.* 2006, 155:757–761.

167. **Brazg RL, Bierman EL.** Insulin excess counteracts the effects of HDL on intracellular sterol accumulation. *Diabetologia.* 1993, 36:942-947.

168. **Kiess W, Anil M, Blum WF et al.** Serum leptin levels in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus in relation to metabolic control and body mass index. *Eur J Endocrinol.* 1998, 138:501-9.
169. **Verrotti A, Basciani F, Morgese G.** Leptin levels in non-obese and obese children and young adults with type 1 diabetes mellitus . *European Journal of Endocrinology.* 1998, 139 (1) 49-53.
170. **Karagüzel G, Ozdem S, Boz A et al.** Leptin levels and body composition in children and adolescents with type 1 diabetes. *Clin Biochem.* 2006, 39(8):788-93.
171. **Myers SE, Albert SG, Haas MJ.,** Pubertal changes in serum leptin levels in adolescents with type 1 diabetes mellitus: a controlled longitudinal study. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2004, 17(12):1653-62.
172. **Verrotti A, Basciani F, De Simone M.** Leptin concentration in non-obese and obese children with type 1 diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother.* 2000, 54(2):69-73.
173. **Zachrisson I, Wallenseen M, Dalquist G et al.** Determinat of blood glucose variability in adolescens with insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta paediatrica .* 1996, 84:70-74.
174. **Orci L, Baetens D, Ravazzola M et al.** Pancreatic polypeptide and glucagon: non-random distribution in pancreatic islets. *Life Sci.* 1976, 19:1811-5.
175. **El-Salhy M, Sitohy B.** Abnormal gastrointestinal endocrine cells in patients with diabetes type 1: Relationship to Gastric Emptying. *Scand J Gastroenterol.* 2001, 36:1162-9.
176. **See MC, Birnbaum AH, Schechter CB et al.** Double-blind, placebo-controlled trial of famotidine in children with abdominal pain and dyspepsia. *Dig Dis Sci.* 2001, 46:985–992.
177. **Weydert JA, Ball TM, Davis MF.** Systematic Review of Treatments for Recurrent Abdominal Pain . *Pediatrics.* 2003, 111:1-11.
178. **Chelimsky G, Boyle JT, Tusing L et al.** Autonomic abnormalities in children with functional abdominal pain: coincidence or etiology? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001, 33 :47 –53.
179. **Hyams JS, Hyman PE.** . Recurrent abdominal pain and the biopsychosocial model of medical practice. *J Pediatr.* 1998, 133 :473–478.

180. **DiLorenzo C, Youssef NN, Sigurdsson L et al.** Visceral hyperalgesia in children with functional abdominal pain. *J Pediatr.* 2001, 139 :838 –843.
181. **Youssef NN, DiLorenzo C.** The role of motility in functional abdominal disorders in children. *Pediatr Ann.* 2001, 30 :24 –30.
182. **Wood JD, Alpers DH, Andrews PLR.** Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut.* 1999, 45(II):6 –16.
183. **McMillin DL, Richards DG, Mein EA et al.** The abdominal brain and enteric nervous system. *J Altern Complement Med.* 1999, 5:575 –586.
184. **Nishizawa I, Suzuki H, Nomoto T.** Enhanced plasma ghrelin levels in patients with functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006, 2(1) 104-110.
185. **Shiia T, Nakazato M, Mizuta M et al.** Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002, 87:240–244.
186. **Youssef NN, DiLorenzo C.** The role of motility in functional abdominal disorders in children. *Pediatr Ann.* 2001, 30 :24 –30.
187. **Booth DA.** Some characteristics of feeding during streptozotocin-induced diabetes in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1972, 80: 238–249.
188. **Kahn BB, Flier JS.** Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000, 106: 473–481.
189. **Kahn Se, D'Alessio DA, Schwartz MW et al.** Evidence of cosecretion of islet amyloid polypeptide. *Diabetes.* 1990, 39:634-638.
190. **Funahashi T, Shimomura I, Hiraoka H et al.** Enhanced expression of rat obese (ob) gene in adipose tissues of ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 211: 469–475.
191. **Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV et al.** Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro. *Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro.* *J W Kolaczynski, M RDiabetes.* 45: 5 699-701.
192. **Association, American Diabetes.** Standards of Medical Care in Diabetes . *Diabetes Care.* 2005, 28 :4-36.

11 Publikační činnost

11.1 Články v impaktovaných časopisech

1. **Huml M., Kobr J, Siala K, Varvařovská J, Pomahačová R, Karlíková M, Sýkora J.** Gut peptide hormones and paediatric Type 1 diabetes mellitus. *Physiol Res*. Přijato k publikaci 15.10.2010. (IF 1,430).
2. **Sýkora J, Huml M, Siala K., Lád V, Pomahačová R.** Fistulising anorectal Crohn's Disease in severe HLA-B27 associated Enthesitis Related Arthritis . *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* . 2009, 48(4):491-4. (IF 1,486)
3. **Sýkora J, Siala K, Huml M, Varvařovská J, Schwarz J, Pomahačová R.** Evaluation of faecal calprotectin as a valuable non-invasive marker in distinguishing gut pathogens in young children with acute gastroenteritis. *Acta Paediatr.* 2010; 99: 1389-1395. (IF 1.768)
4. **Sýkora J, Pomahačová R, Štechová K, Hrabák J, Varvařovská J, Huml M.** Epidemiology of H.pylori infection in asymptomatic children – a prospective population-based study from the Czech Republic. Application of enzyme - linked immunosorbent assay monoclonal antigen in stool. *Helicobacter.* 2009, 14(4):286-97. (IF 2, 330)
5. **Sýkora J, Pomahačová R, Siala K, Huml M, Varvařovská J.** H. pylori Infection in Children and Adolescent with Type 1 Diabetes Mellitus. *Helicobacter* . 2008, 13: 392-479. (IF 2,470) - abstrakt
6. **Sýkora J, Pomahačová R, Štechová K, Hrabák J, Varvařovská J, Huml M.** The Prevalence of Helicobacter pylori Infection in Juvenile Lymphocytic Thyroiditis in Childhood and Its Role in the Development of Autoimmunity, and Its Role in the Development of Autoimmunity. *Helicobacter* . 2007, 12:379-476. (IF 2,477) - abstrakt

11.2 Ostatní články v časopisech

7. **Huml M, Sýkora J, Lád V., Siala K, Pomahačová R, Vondráková R.** Rozvoj fistulující formy Crohnovy choroby u pacienta s JIA, HLA B27+. *Čes.- slov. Pediatr.* 2009, 64(1):22-27.
8. **Huml M, Sýkora J, Kobr J, Pizingerová K, Šebor J, Skála V, Hadravská Š.** Heterotopický pankreas, ileokolická invaginace v kojeneckém věku. *Pediatr. pro praxi.* 2009, 10(3) – 191-192.

9. **Sýkora J, Huml M**. Chronické průjmy v ordinaci dětského lékaře. *Vox pediatrics*. 2007, 9; 28-32.
10. **Sýkora J, Huml M**. Problematika akutního průjmu u dětí a s tím spojená dehydratace. *Pediatr. pro praxi*. 2008, 9(2):123-124.
11. **Sýkora J, Huml M**. Syndrom neprospívajícího kojence. *Pediatr. pro Praxi* . 2010, 11(4): 240–244.
12. **Sýkora J, Huml M**. Současná diagnostická a terapeutická doporučení infekce *Helicobacter pylori* v dětském věku: Praktické pediatrické hledisko. *Vox pediatrics*. 2009, 9(4):26.
13. **Sýkora J, Schwarz J, Huml M**. Kojenecké kolik. *Pediatr pro praxi*. 2007, 8(4);182-184
14. **Schwarz J, Siala K, Huml M, Sýkora J, Geiger J, Vacek V, Koželuhová J, Vondráková R, Lád V, Kobr J**. Kaustické poranění rektosigmatu u patnáctiletého chlapce. *Čes - slov. Pediat*. 2008, 63(11): 620-625.
15. **Sýkora J, Schwarz J, Huml M**. Kojenecké kolik. *Pediatr pro praxi*. 2007, 8(4);182-184.
16. **Schwarz J, Sýkora J, Siala K., Huml M, Varvařovská J, Kobr J**. Ménétriorova choroba – neobvyklá příčina zvracení. *Pediatr pro praxi*. 2009, 10(6);319-321.
17. **Huml M, Sýkora J, Pomahačová R, Siala K, Hamzová P, Varvařovská J**. *Helicobacter pylori* a Diabetes mellitus typ 1 v dětském věku. *Čes. - slov. Pediat*. 2008, 63(7-8):444-445. - abstrakt.
18. **Huml M, Sýkora J, Pomahačová R, Siala K, Hamzová P, Varvařovská J**. *Helicobacter pylori* a Diabetes mellitus typ 1 v dětském věku. *Čes. - slov. Pediat*. 2008, 63(7-8):444-445. - abstrakt.
19. **Sýkora J, Siala K, Huml M**. Současná doporučení v biologické léčbě (infiximab) idiopatických třevních zánětů, XIV. Sympozium o morfologii a funkci střeva. *Česká gastroenterologická společnost*. 2008, 35-36. - abstrakt.
20. **Sýkora J, Varvařovská J, Stožický F, Huml M, Pomahačová R, Siala K**. Menétriorova choroba v dětském věku: neobvyklé manifestace – dlouhodobé sledování, XIV. Sympozium o morfologii a funkci střeva. *Česká gastroenterologická společnost*. 2009, - abstrakt.

11.3 Postery

1. **Huml M, Sýkora J, Pomahačová R, Siala K, Hamzová P, Varvařovská J.** Helicobakter pylori a Diabetes mellitus typ 1 v dětském věku, Český pediatrický kongres s mezinárodní účastí, Jihlava, září 2008
2. **Huml M, Sýkora J, Varvařovská J, Siala K, Pomahačová R, Karlíková M, Kobr J.** Gastrointestinální hormony a Diabetes mellitus typu 1 v dětském věku. Český pediatrický kongres s mezinárodní účastí, Olomouc 2010
3. **Karlíková M, Huml M, Sýkora J, Varvařovská J, Topolčan O,** Preanalytické a analytické aspekty multiplexového stanovení gastrointestinálních hormonů v krevní plazmě, Imunoanalytické dny, XXX, 2009, duben
4. **Jehlička P, Huml M, Votava T, Kobr J.** Reactive Hyperemia Index and detection of endothelial dysfunction in children. Artery 10, Verona (Itálie) 2010

11.4 Přednášky

1. **Huml M.** Školitel: Doc. MUDr. J. Sýkora, Ph.D., *Dětská klinika LF UK a FN v Plzni* Vliv gastrointestinálního traktu na kompenzaci diabetu mellitus 1. typu u dětí, Studentská vědecká konference – 23. 05. 2007
2. **Huml M, Sýkora J., Kobr J., Pizingerová K., Šebor J., Skála V., Hadravská Š.** - Heterotopický pankreas, ileokolická invaginace v kojeneckém věku a přehled literatury, Plzeňské pediatrické dny 2008
3. **Huml M,** Školitel: Doc.MUDr. J. Sýkora, Ph.D - Vliv gastrointestinálního traktu na kompenzaci Diabetu mellitu 1. typu u dětí: Aktivní infekce Helicobakter pylori., studentská vědecká konference v Plzni 2008
4. **Huml M, Sýkora J., Pomahačová R., Siala K., Hamzová P., Varvařovská J.,** Helicobakter pylori a Diabetes mellitus typ 1 v dětském věku, Plzeňské pediatrické dny 2009
5. **Huml M.** Školitel: Doc. MUDr. J. Sýkora, Ph.D - Gastrointestinální hormony a Diabetes mellitus typu 1 v dětském věku., studentská vědecká konference v Plzni 2009
6. **Huml M, Lád V., Jehlička P., Kobr J., Pizingerová K.** Problematika koarktace aorty a interrupce aortálního oblouku v novorozeneckém a kojeneckém věku, Večer dětské kliniky Plzeň, říjen 2008

7. **Jehlička P, Huml M, Stožický F.** Nová vyhledávací vyšetření a jejich přínos pro časnou detekci endotheliální dysfunkce v dětském věku – perspektivy preventivní kardiologie, Večer dětské kliniky Plzeň, říjen 2009
8. **Zunová J, Sládková E, Huml M.** Akutní pyelonefritida v dětském věku, Plzeňské pediatrické dny 2009
9. **Huml M, Jehlička P, Kobr J, Lád V.** Dvě odlišné formy manifestace srdečního onemocnění při coxsackie infekci, Pediatické dny Plzeň 20.03.2010
10. **Sýkora J, Huml M, Kobr J, Pizingerová K, Šebor J, Skála V., Hadravská Š.** Heterotopický pankreas – ileokolická invaginace v kojeneckém věku. Přehled literatury. XVI. symposium o morfologii a funkci střeva. Staré Splavy. 22.-24.4.2010