

Universita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni

Dětská klinika Fakultní nemocnice v Plzni

MUDr. Michal Huml

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

Gastrointestinální hormony

2010

Autoreferát dizertační práce k získání akademického titulu Ph.D.

Obor: Pediatrie

2010



Dizertační práce byla vypracována v rámci kombinované formy doktorského studijního programu na Dětské klinice fakultní nemocnice v Plzni, Universita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni.

Uchazeč: MUDr. Michal Huml

Dětské klinice fakultní nemocnice v Plzni, Universita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni.

Školitel: Doc. MUDr. Josef Sýkora, Ph.D.

Dětské klinice fakultní nemocnice v Plzni, Universita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni.

Oponenti:

1. **As. MUDr. Petr Dědek, Ph.D.** Dětské klinice fakultní nemocnice v Hradci Králové, Universita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové.
2. **Prof. MUDr. Zdeněk Rušavý, Ph.D.** I. interní klinika fakultní nemocnice v Plzni, Universita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni.

Stanovisko dizertační práce bylo vypracováno na Dětské klinice fakultní nemocnice v Plzni, Universita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni.

Přednosta: Doc. MUDr. Jiří Kobr, Ph.D.

Autoreferát byl rozeslán dne.....

Obhajoba dizertační práce se koná dne 09. 12. 2010 v..... hod.. Před komisí pro obhajoby disertačních prací doktorského studijního programu v oboru pediatrie v Plzni, Seminární místnost Dětské kliniky FN Plzeň, Alej Svobody 80, vchod F, 6. patro.

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu lékařské fakulty v Plzni, Husova 3.

Předseda komise pro obhajoby v oboru pediatrie: : Doc. MUDr. Jiří Kobr, Ph.D.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Diabetes mellitus typ 1	1
1.1.1	Epidemiologie T1DM	1
1.1.2	Faktory ovlivňující kompenzaci T1DM.....	2
2	Cíle práce	4
3	Materiál a metodika	5
3.1	Soubor.....	5
3.2	Protokol studie a laboratorní analýza	8
3.1	Statistika	9
4	Výsledky	9
4.1	GIT hormony u T1DM jedinců	10
4.2	GIT hormony u skupiny jedinců dle hladiny glykovaného hemoglobinu	13
4.3	GIT hormony a FBB	16
5	Závěry	17
6	Souhrn	18
7	Summary	20
8	Literatura.....	22
9	Publikační činnost	24

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

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

ISPAD – Mezinárodní společnost pro dětský a juvenilní diabetes

PP - pankreatický polypeptid

PYY - peptid YY

RAP – recidivující bolesti břicha

T1DM - Diabetes mellitus typ 1

xMAP Luminex – multiplexová metoda Luminex

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 Langerhansových ostrůvků pankreatu. 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. 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 (1). Průběh onemocnění můžeme rozdělit do 4 stadií: (1) preklinické stadium (destrukce β -buněk pankreatu), (2) postupné propuknutí onemocnění, (3) přechodná remise „honeymoon period“, (4) vlastní onemocnění.

1.1.1 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. V poslední dekádě dochází k významnému nárůstu incidence T1DM ve vyspělých státech Evropy a světa v celém spektru věkových skupin dětských pacientů. Nejprogresivněji je tomu u dětí nejmladších věkových skupin, tj. v předškolním věku.

1.1.2 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 thyroiditis, 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.

1.1.2.1 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 vykoupena vyššími váhovými přírůstky a současně třikrát vyšším rizikem hypoglykemie především v době adolescence. 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 hormonů – 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 motilitou GIT (amy-

lin, GIP, GLP-1, PYY), působí na produkci glukózy játry (amylin, ghrelin, PP, ghrelin, gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide 1, peptid YY, leptin), inzulínovou sekrecí (amylin, ghrelin, GIP, GLP-1, PP) či zvyšují přežití β -buněk Langerhansových ostrůvků. Popis účinků jednotlivých hormonů ve vztahu k diabetu mellitu a jeho kompenzaci (**tabulka 1**). 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.

Tabulka 1: Účinky specifických hormonů

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

Legenda: ↑ - zvýšený účinku; ↓ - snížení účinku; GIT – gastrointestinální trakt; N/A – nelez aplikovat, GIT – gastrointestinální trakt

2 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. Substitute některých z těchto gastrointestinálních hormonů u T1DM dospělých pacientů vede 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 analytické multiplexové 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, inzulín, 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.

3 Materiál a metodika

3.1 Soubor

Všichni pacienti byli před zařazením do studie klinicky vyšetřeni a byly stanoveny jejich základní biochemické a antropometrické parametry. 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 2, 3 a 4**. Jednotlivá data od všech probandů byla získána v průběhu 12 měsíců.

3.1.1 T1DM

Z celkového počtu pacientů s T1DM (n=113; 64/49 chlapců/dívek) sledovaných v endokrino-logické poradně Dětské kliniky Fakultní nemocnice v Plzni bylo do studie zařazeno na základě vstupních kritérií 19 T1DM pacientů (**Tabulka 2**). T1DM pacienti byli léčeni inzulínem intenzifikovaným režimem minimálně 4 roky (průměrná doba od diagnózy: 6.5 roku, průměrné dávky inzulínu: 0.92 IU/kg/den, průměrné hodnoty HbA_{1c}: 7.2%). V další fázi studie byla skupina T1DM rozdělena dle hodnoty glykovaného hemoglobinu na skupinu s jedinci, kteří měli hodnotu HbA_{1c}% >7% (n=9) a skupinu s jedinci s hodnotou HbA_{1c}% <7% (n=10)

k posouzení vlivu kompenzace onemocnění na hladiny GIT hormonů (**Tabulka 3**). Pacienti s T1DM trvajícím 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.

3.1.2 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 (**Tabulka 2**). Všichni probandi před zařazením do studie absolvovali vstupní kompletní klinické výstřední. 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 antiinflogistika nebo jiné přípravky ovlivňující chuť či motilitu trávicího traktu.

3.1.3 FBB

Druhou kontrolní skupinu tvořilo 15 pacientů, kteří byli sledováni v gastroenterologické poradně Dětské kliniky Fakultní nemocnice v Plzni pro FBB (**Tabulka 4**). 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 mohl jinak vysvětlit symptomy pacienta. Obtíže musí pacient udávat nejméně 1x týdně po dobu alespoň 2 měsíců. 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 2

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 3

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/m²)	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 4

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.

3.2 Protokol studie a laboratorní analýza

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 k plánované laboratorní kontroly nebo vyšetření v rámci dispenzarizace v odborných poradnách dětské kliniky. Ke stanovení hladiny jednotlivých GIT hormonů a hormonů související s metabolismem glukózy (aktivní ghrelin, leptin, GIP, aktivní GLP-1, amylin, PP, PYY a inzulin) byl použit multiplexový kit (LINCOp[®]). Všechna měření byla provedena speciálně vyškoleným pracovníkem. 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. Je-

dinci z kontrolní skupiny a skupiny FBB si neaplikovali žádný inzulín. Další analýza zahrnovala zpracování demografických údajů, pohlaví, výška, váha, trvání onemocnění, hladinu glykovaného hemoglobinu (HbA_{1c}), aktuální glykémii, denní dávku inzulínu, lipidové spektrum a BMI.

3.1 Statistika

Hladiny jednotlivých zkoumaných hormonů jsou vyjádřeny pomocí průměrné hodnoty a směrodatné odchylky, mediánu a interkvartilového rozmezí. Pro počítání rozdílů mezi skupinami zdravých kontrol a T1DM a skupinami FBB a T1DM byl použit vzhledem k povaze biologických populací neparametrický Wilcoxonův párový test. Pro hodnocení rozdílů skupin T1DM stratifikovaných 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/m^2), inzulínem (IU/kg) a lipidovým spektrem (HDL, LDL, triglyceridy) byla stanovena užitím Spearmanova a Kendallůva 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.

4 Výsledky

Ve výsledkové části jsou uvedeny hladiny 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

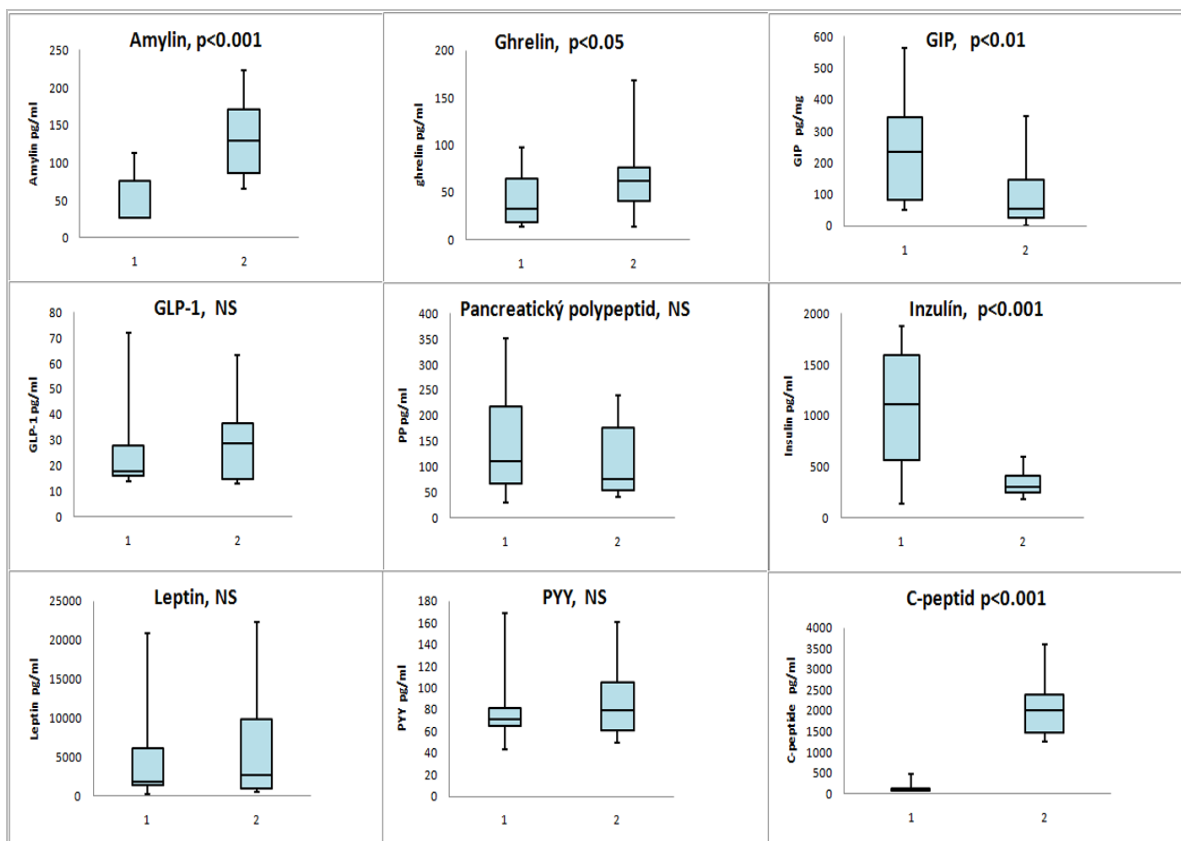
uvedena navíc step-wise regresní analýza. Mezi jednotlivými vyšetřovanými skupinami jsme nenalezli signifikantní rozdíly ve věkovém rozložení, rozložení pohlaví, rasy, výšky, váhy a BMI.

4.1 GIT hormony u T1DM jedinců

4.1.1 GIT hormony

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 ($p < 0.05$) a inzulínu ($p < 0.01$) byla elevována v porovnání se zdravou populací. Hladiny ostatní sledovaných hormonů se statisticky nelišily. **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;; NS- nesignifikantní hodnota

4.1.2 Korelační analýza

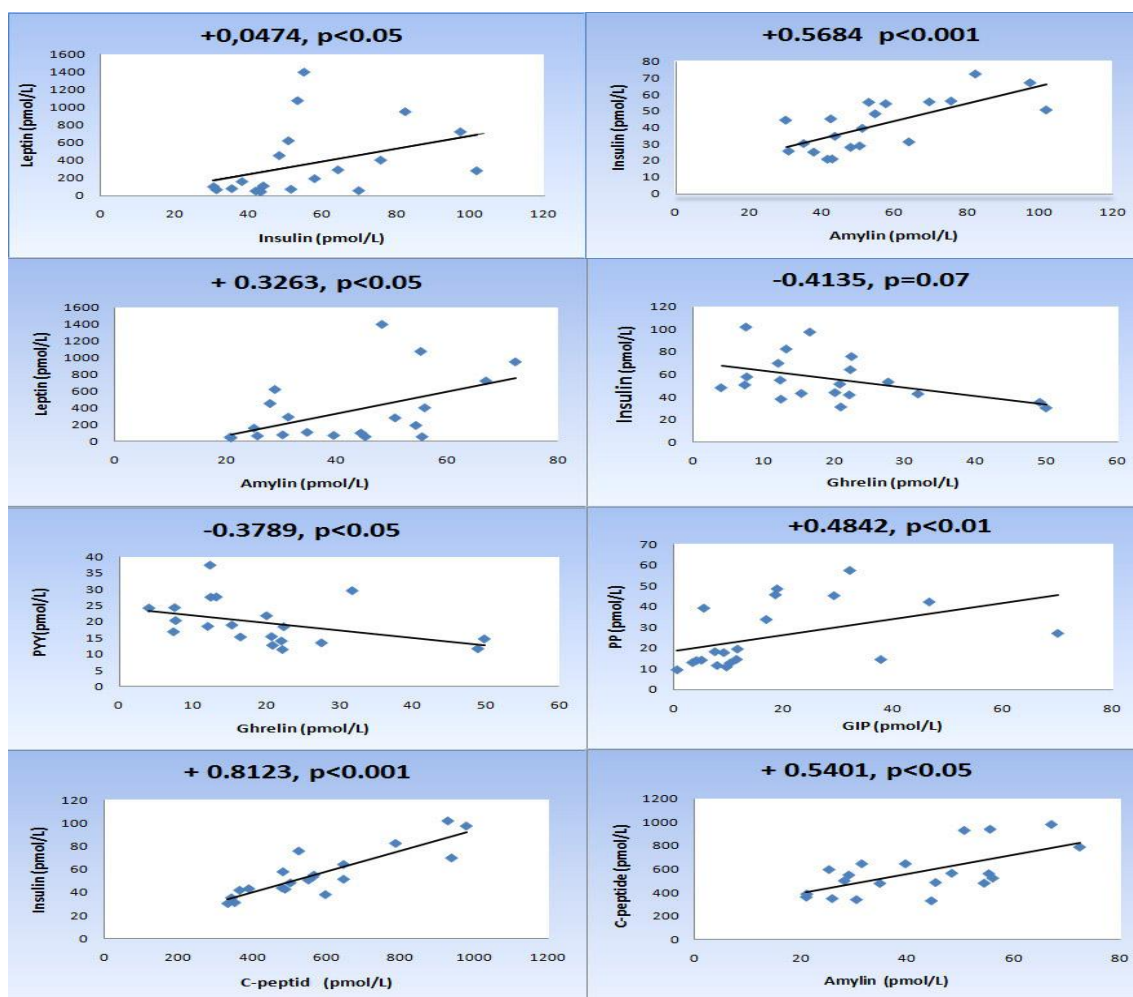
4.1.2.1 Korelace plasmatických hladin GIT peptidů u T1DM a kontrolní skupiny

4.1.2.1.1 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 ($r= - 0.5323$; $p<0.05$). **Graf 2**

Graf 2

Korelace plasmatických hladin GIT peptidů u zdravých kontrol



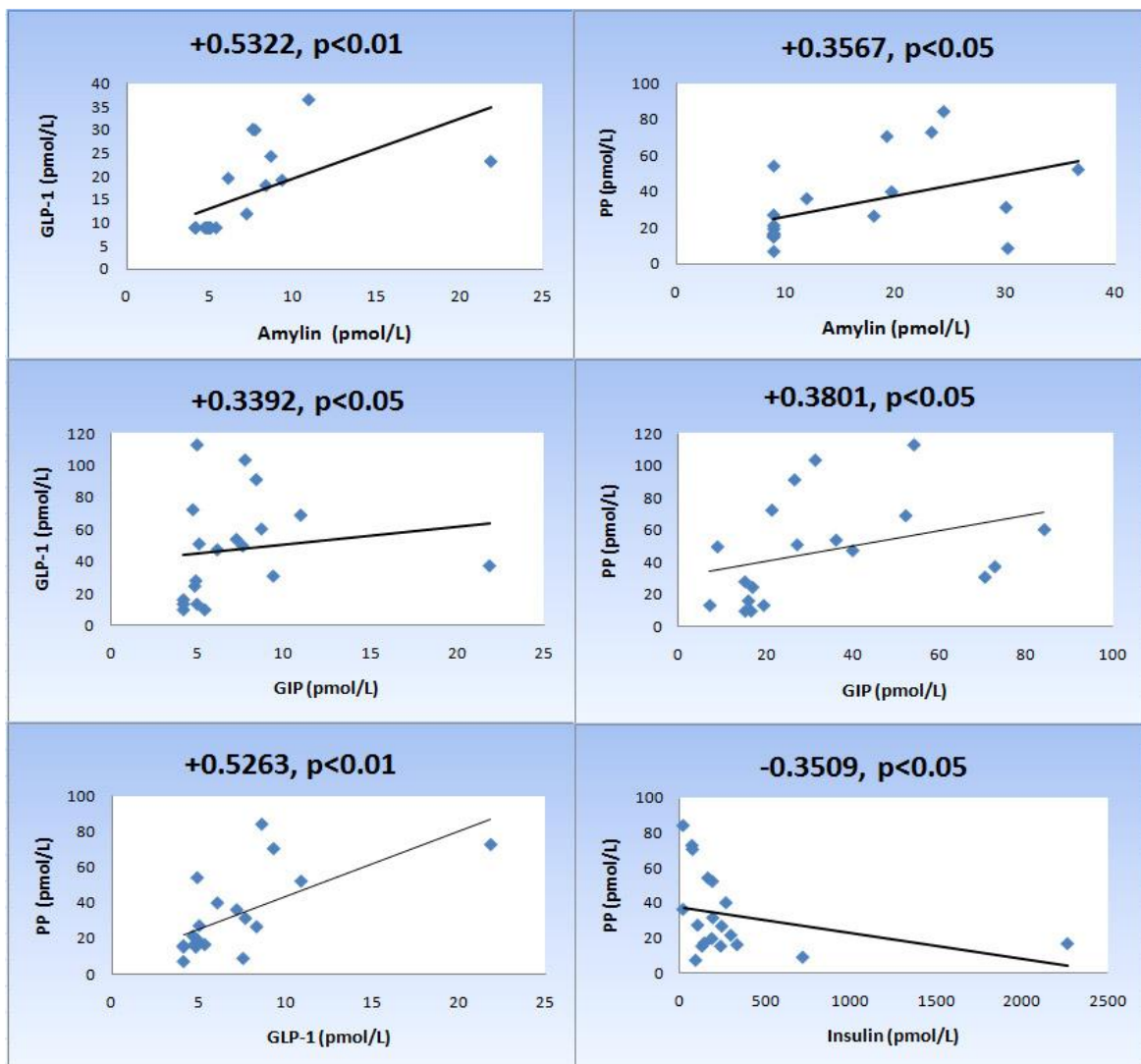
Legenda: Jednotlivé korelace mezi hladinami GIT hormonů u zdravých kontrol; **p** – p-hodnota

4.1.2.1.2 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 ($r=-0.4704$; $p<0.05$). **Graf 3**

Graf 3

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

4.1.2.2 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 diabetu. 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 další korelací nebyla statisticky signifikantní.

4.1.2.3 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.

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

4.2.1 GIT hormony

4.2.2 T1DM⁺⁷

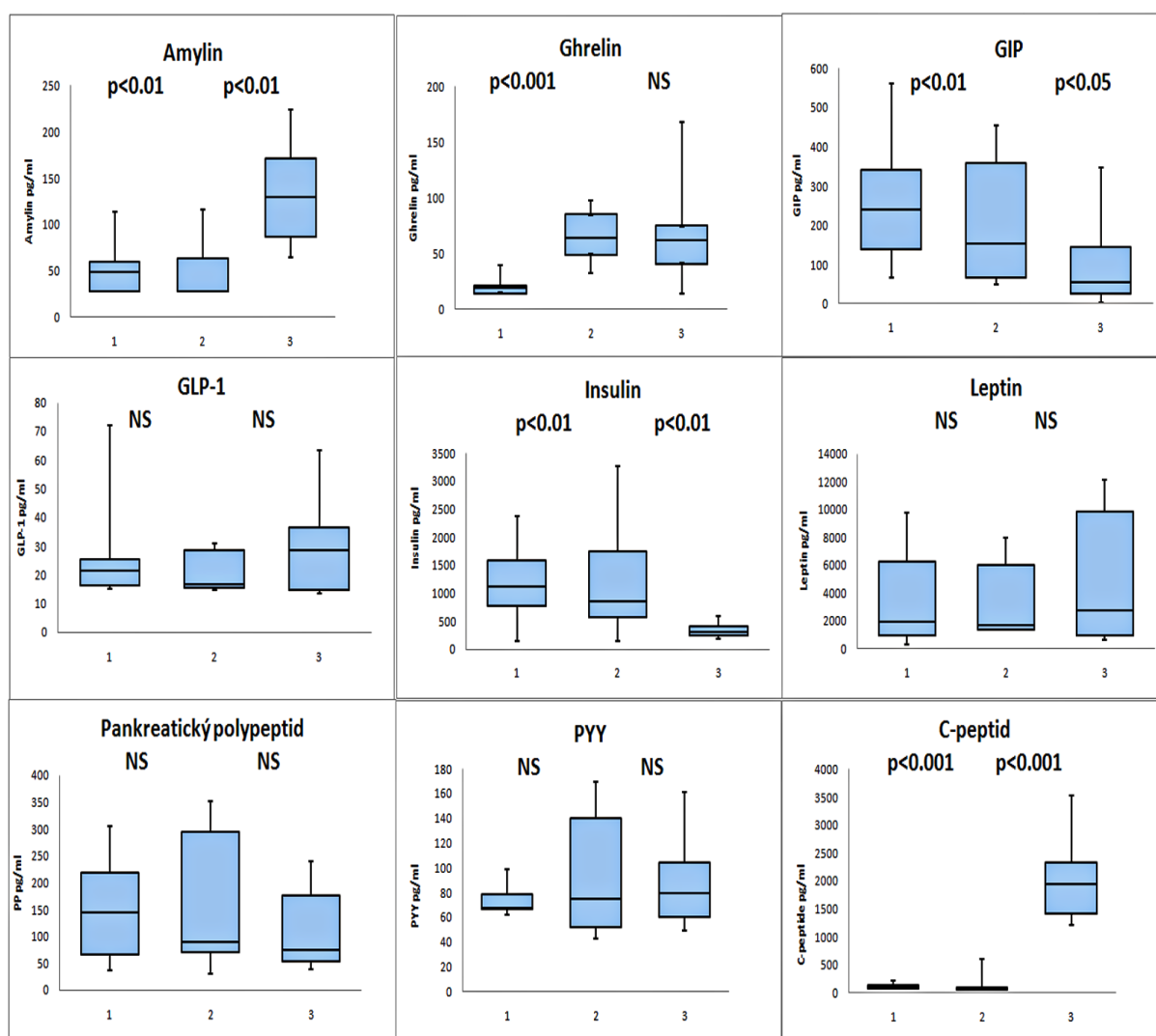
U skupiny T1DM⁺⁷ pacientů byly nalezeny signifikantně nižší hladiny amylinu ($p<0.01$), ghrelinu ($p<0.001$) a C-peptidu ($p<0.001$), naopak hladina GIP ($p<0.01$) a inzulínu ($p<0.01$)

byla elevována v porovnání se zdravou populací (**Graf 4**). Hladiny ostatní sledovaných hormonů se statisticky nelišily.

4.2.3 T1DM⁻⁷

U skupiny T1DM⁻⁷ pacientů byly nalezeny signifikantně nižší hladiny amylinu ($p < 0.001$), a C-peptidu ($p < 0.001$), naopak hladina GIP ($p < 0.05$) a inzulinu ($p < 0.01$) byla elevována v porovnání se zdravou populací (**Graf 4**). Hladiny ostatní sledovaných hormonů se statisticky nelišily.

Graf 4



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

4.2.4 Korelační analýza

4.2.4.1 Korelace plasmatických hladin GIT peptidů a biochemických parametrů u skupin T1DM⁷

Ve skupině T1DM⁷ 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 - insulin - IU/kg/den ($r= -0.6809$; $p<0.05$). Žádná z dalších korelací nebyla statisticky signifikantní.

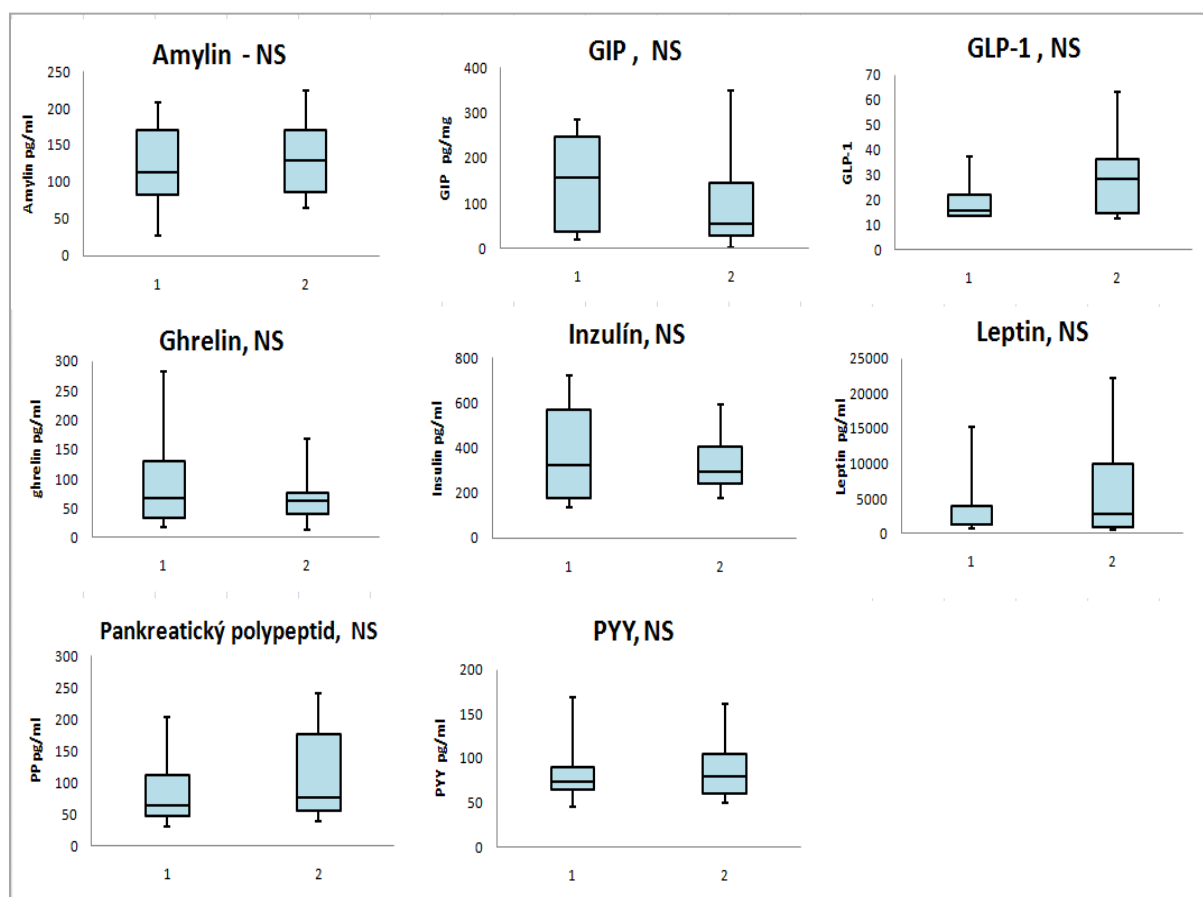
4.2.4.2 Korelace plasmatických hladin GIT peptidů a biochemických parametrů u skupin T1DM⁷

Ve skupině T1DM⁷ pacientů byla nalezena pozitivní korelace ghrelinu a HDL ($r= 0.8000$; $p<0.05$) a 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 dalších korelací nebyla statisticky signifikantní.

4.3 GIT hormony a FBB

Hladiny sledovaných hormonů u pacientů s FBB se statisticky nelišily v porovnání se zdravou populací. **Graf 5**

Graf 5



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 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 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.

6 Souhrn

Cílem bylo studovat vybrané GIT hormonů a hormonů související s metabolismem glukózy. Pomocí multiplexového kitu (LINCoplex[®]) 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 analogu 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.

7 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 hormones 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 (LINCOp[®]) 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.

8 Literatura

1. **Pietropaolo 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 .
2. **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.
3. **Panagiotidis G, Salehi AA, Westermark P et al.** Homologous islet amyloid polypeptide: effects on plasma levels of glucagon, insulin and glukose in the mouse. *Diabetes Res Clin Pract*. 1992, 18:167-171.
4. **Sinha MK, Caro JF.** Clinical aspects of leptin. *Vitam Horm*. 1998, 54:1-30.
5. **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.
6. **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.
7. **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.

8. **Spånge A, El-Salhy M.** Large intestinal endocrine cells in nonobese diabetic NOD-mice. *J Diabetes Comp* . 1998, 2:321–7.
9. **Alemzadeh R, Wyatt DT.** Diabetes mellitus in children. Klinedman RM, Jenson HB Berhmna RE. *Nelson textbook of peditrics* . Philidelphia : Elsevier, 2005.
10. **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.
11. **Hanukoglu A, Chalew S, Kowarski AA et al.** Human pancreatic polypeptide in children and young adults. *Horm Metab Res.* 1990, 22(1):41-3.
12. **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.
13. **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.
14. **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.
15. **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.
16. **Casares S, Brumeanu TD.** Insights into the pathogenesis of T1DM: A hint for novel immunospecific therapies. *Curr Molec Med* . 2001, 1:357–378.
17. **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.
18. **Ranganath L, Sedgwick I, Morgan L et al.** The ageing entero-insular axis. *Diabetologia.* 1998, 411:309–13.

19. **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.

20. **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.

9 Publikační činnost

9.1 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 mellitu. *Physiol Res*. 2010; 10 Přijato k publikaci (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

9.2 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. Pediat.* 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.** Helicobakter 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.** Helicobakter 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.** Menetrierova choroba v dětském věku: neobvyklé manifestace – dlouhodobé sledování, XIV. Sympozium o morfologii a funkci střeva. *Česká gastroenterologická společnost.* 2009 - abstrakt.

9.3 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