

LEK. MAŁGORZATA SZYMAŃSKA

TYTUŁ PRACY: „OCENA ZABURZEŃ METABOLIZMU KOSTNEGO W PRZEBIEGU

CUKRZYCY TYPU 1 U DZIECI I MŁODZIEŻY”

STRESZCZENIE

Zaburzenia metabolizmu kostnego uważane są za jedno z częstszych a zarazem istotnych powikłań występujących u dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1 (T1D). Częstość występowania tych zaburzeń nie jest jeszcze jednoznacznie określona. Na podstawie aktualnych doniesień u dzieci z kilkuletnim okresem trwania cukrzycy, można szacować, iż problem ten dotyczy ponad 50% pacjentów, u których stwierdza się deficyt gęstości kostnej BMD w odcinku lędźwiowym kręgosłupa. Według innych publikacji, wśród populacji osób w średnim wieku z T1D bez istotnych powikłań, aż 57% kobiet i 67% mężczyzn ma rozpoznaną osteopenię, zaś 14% mężczyzn spełnia kryterium rozpoznania osteoporozy.

Według obecnie stosowanej definicji WHO osteoporoza jest układową chorobą szkieletu, charakteryzującą się małą masą kostną oraz zaburzeniami mikroarchitektoniki tkanki kostnej, które wywołują zwiększoną kruchość kości i ryzyko ich złamań. Za kryterium rozpoznania osteoporozy w populacji dziecięcej przyjmuje się obniżenie gęstości mineralnej o więcej aniżeli dwa odchylenia standardowe od średniej dla wieku i płci (Z -score < -2). Osteopenię definiuje się z kolei jako stan, w którym gęstość mineralna kości jest niższa od przeciętnej dla wieku i płci (Z -score między -1 a -2).

Wpływ gospodarki węglowodanowej na regulację metabolizmu kostnego nie został jeszcze do końca poznany. Za udokumentowane dotychczas czynniki patogenetyczne rozwoju osteopenii/osteoporozy w T1D są uważane: niedobór insuliny i insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1), hiperglikemia, kwasica metaboliczna, dyslipidemia, niedobór aktywnej witaminy D, zwiększone wydalanie wapnia z moczem, niższe stężenie wolnych

hormonów płciowych, a także współistnienie celiakii i/lub innych chorób autoimmunologicznych.

Należy podkreślić, że zaburzenia metabolizmu kostnego kości są szczególnie nasilone w momencie klinicznego rozpoznania cukrzycy. Jest to następstwem współwystępującej kwasicy ketonowej zwiększającej aktywność osteoklastów oraz wydaje się być związane z przemijającym stanem katabolicznym spowodowanym niedoborem insuliny zmniejszającym wytwarzanie białek, a zatem i białek macierzy kostnej, oraz zmniejszeniem mineralizacji kości i aktywności osteoblastów.

Za główne markery obrotu kostnego uznawane są: osteokalcyna, osteoprotegeryna i jej receptor sRANKL w surowicy krwi, a także pirydolina/dezoksypirydolina w moczu. Osteokalcyna będąca hormonem wytwarzanym przez osteoblasty, odontoblasty i hipertroficzne chondrocyty wydaje się mieć wpływ na metabolizm glukozy, uwalnianie insuliny i stymulację insulino-wrażliwości. Insulina posiada w obrębie osteoblastów receptory, których aktywacja prowadzi do produkcji osteokalcyny, zatem insulina pośrednio wpływa na proces kościotworzenia. Połączenie insuliny z receptorem w osteoblastach doprowadza z kolei do obniżenia aktywności osteoprotegeryny (OPG) i zwiększenia aktywności osteoklastów oraz resorpcji kości. Obniżenie wartości osteoprotegeryny i zmiana stosunku OPG/RANKL sprzyjają aktywacji resorpcji. Pirydolina oraz dezoksypirydolina są z kolei aminokwasami, które tworzą międzyłańcuchowe poprzeczne wiązania kowalencyjne obecne tylko w dojrzałych formach kolagenu, stabilizujące strukturę włókien. Podczas resorpcji kości, usieciowane kolageny ulegają rozkładowi proteolitycznemu, a składniki sieciujące są uwalniane do krążenia i moczu.

Coraz więcej doniesień potwierdza niedobór witaminy D u pacjentów ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1. W plejotropowym działaniu witaminy D istotną rolę odgrywa receptor witaminy D (VDR). Prawidłowy proces mineralizacji kości zależy od witaminy D. Witamina D oddziałując na różne populacje komórek kostnych, bierze udział w regulacji pomiędzy resorpcją kostną a kościotworzeniem. Kalcytriol łącząc się ze swoim receptorem zlokalizowanym na osteoblastach, aktywuje geny kodujące białka niezbędne

dla różnicowania osteoklastów i resorpcji kostnej. Aktywna postać witaminy D reguluje także aktywność wybranych genów dla białek macierzy kostnej.

Aktualnie obowiązujące zalecenia opracowane w 2018 r. przez grupę polskich ekspertów dotyczące dawkowania witaminy D u dzieci uwzględniają kryterium wieku, a także dodatkowo występowanie otyłości. Pomimo pojawiających się coraz bardziej aktualnych doniesień naukowych dotyczących niedoboru witaminy D u dzieci i młodzieży ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1, żadne z obowiązujących wytycznych, zarówno Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (PTD) jak i American Diabetes Association (ADA), nie uwzględniają diagnostyki zaburzeń metabolizmu kostnego w tej grupie pacjentów. Do rozpoznania zaburzeń metabolizmu kostnego u dzieci i młodzieży są wykorzystywane zarówno badania laboratoryjne, jak i metody ilościowe. W rutynowych badaniach laboratoryjnych ocenie podlegają: stężenie wapnia całkowitego i fosforu w surowicy oraz w moczu, aktywność fosfatazy alkalicznej i stężenia metabolitu wątrobowego witaminy D (25OHD) oraz parathormonu w surowicy. Ponadto analizowane są wybrane markery obrotu kostnego. Do badań pozalaboratoryjnych oceniających gęstość mineralną kości należy badanie densytometryczne kośćca metodą absorpcjometrii promieniowania X o podwójnej energii (dual energy X-ray absorptiometry – DXA) z uwzględnieniem projekcji AP spine oraz total body, uznawane za złoty standard diagnostyki ilościowej oraz ilościowa metoda ultradźwiękowa (quantitative ultrasound – QUS) jako metoda pomocnicza.

Celem pracy była:

1. Ocena stężenia metabolitu 25OH witaminy D w surowicy dzieci i młodzieży ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1 w porównaniu z grupą kontrolną
2. Analiza wykładników metabolizmu kostnego w oparciu o biochemiczne markery obrotu kostnego oraz badania ilościowe (badanie densytometryczne) u pacjentów ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1 w porównaniu z grupą kontrolną.
3. Ocena wpływu wyrównania metabolicznego cukrzycy po 7 miesiącach jej trwania na stężenie metabolitu 25OH witaminy D oraz stan mineralizacji kośćca u pacjentów z cukrzycą typu 1.

4. Analiza związku stężenia metabolitu 25OH witaminy D z obecnością częściowej remisji klinicznej u pacjentów z cukrzycą typu 1.
5. Zaproponowanie schematu diagnostyki zaburzeń metabolizmu kostnego oraz postępowania dotyczącego dawkowania witaminy D u dzieci ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1.

Badaniem zostało objętych 100 pacjentów hospitalizowanych w Klinice Pediatrii, Diabetologii, Endokrynologii i Nefrologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z powodu nowo rozpoznanej cukrzycy typu 1 zgodnie z wytycznymi WHO, pozostających dodatkowo pod opieką Centrum Leczenia Osteoporozy i Innych Chorób Metabolicznych Kości Dzieci i Młodzieży w Łodzi, w tym 40 dziewczynek i 60 chłopców w wieku od 5,1 do 17,7 lat. Kryteria wyłączenia z grupy badanej obejmowały: choroby tarczycy (klinicznie jawne postaci niedoczynności lub nadczynności tarczycy), celiakię, otyłość, niskorosłość, choroby nowotworowe, a także towarzyszącą infekcję układu oddechowego lub moczowego z istotnie podwyższonym wykładnikiem stanu zapalnego (CRP) oraz suplementację witaminy D w dawce terapeutycznej.

Ocena wykładników metabolizmu kostnego oraz parametrów przebiegu klinicznego T1D została przeprowadzona w dwóch punktach czasowych: w trakcie pierwszej hospitalizacji w związku z rozpoznaniem klinicznie jawnej T1D, a także po średnio 7 (6-8) miesiącach od rozpoznania. W drugim punkcie czasowym oceniono również częściową remisję kliniczną cukrzycy, definiowaną jako zapotrzebowanie na insulinę $<0,5$ IU/kg i HbA1c $<7\%$. Drugie badanie densytometryczne przeprowadzane było w przedziale czasowym pomiędzy 6 a 12 miesiącem od rozpoznania T1D.

Grupę kontrolną stanowiło 52 pacjentów, w tym 33 dziewczynek oraz 19 chłopców w wieku od 7.2 do 18 lat hospitalizowanych w Klinice Pediatrii, Diabetologii, Endokrynologii i Nefrologii UM w Łodzi, a także w Klinice Pediatrii, Patologii Noworodka i Chorób Metabolicznych Kości UM w Łodzi. Pacjenci z grupy kontrolnej byli bez zaburzeń tolerancji glukozy i innych zaburzeń metabolicznych, a także bez złamań kostnych w wywiadzie.

Na przeprowadzone badanie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi nr RNN/218/15/KE.

Badania przeprowadzone rutynowo u dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1 obejmowały: poziom HbA1c (%), stężenie peptydu C (ng/ml) (na czczo i w teście z glukagonem), miano przynajmniej 2 autoprzeciwciał charakterystycznych dla cukrzycy typu 1 (ICA, anty-GAD, anty-IA2 oraz ZnT8), pH, BE (mmol/l), TSH (μ IU/ml), fT3, fT4 (ng/dl), przeciwciała anty-TPO (IU/ml), anty-TG (IU/ml), przeciwciała anty-tTg w klasie IgA (RU/ml) i IgG, haplotyp celiakalny DQ2/DQ8, zapotrzebowanie na insulinę (IU/kg) oraz BMI Z-score. Za wyjątkiem autoprzeciwciał charakterystycznych dla cukrzycy pozostałe parametry przebiegu klinicznego T1D były oznaczane dwukrotnie i zostały wykorzystane do następczej analizy w odniesieniu do markerów metabolizmu kostnego: metabolitu 25(OH) witaminy D, osteokalcyny (OC), osteoprotegeryny (OPG) i jej receptora s-RANKL oznaczonych w surowicy krwi, a także stężenie dezoksyperydynoliny w moczu (DPD). Badanie densytometryczne wykonano w projekcji Total body (TBLH) oraz spine (L1-L4), oceniając wartości bezwzględne gęstości mineralnej kości (BMD) wyrażonej w g/cm^2 oraz wskaźnik Z-score.

Wyniki:

Analizując poszczególne parametry zaburzeń metabolizmu kostnego stwierdzono, iż u pacjentów z nowo rozpoznaną T1D poziom metabolitu 25(OH) witaminy D był niższy w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,001$), a następnie wzrastał w grupie badanej po okresie kilkumiesięcznej obserwacji ($p < 0,001$). Nie zaobserwowano istotnie statystycznej różnicy w jego poziomie pomiędzy grupą pacjentów z cukrzycą typu 1 w trakcie dalszej obserwacji a grupą kontrolną ($p = 0,563$).

Najniższe stężenie osteokalcyny zaobserwowano u pacjentów w momencie wystąpienia T1D w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,001$), a następnie stwierdzono jego wzrost w trakcie dalszej obserwacji ($p < 0,001$). Stężenie OPG w grupie badanej było wyższe w momencie wystąpienia T1D w porównaniu z grupą kontrolną ($p = 0,024$), a następnie uległo obniżeniu w czasie 7-miesięcznej obserwacji ($p < 0,001$), wykazując tendencję do niższego poziomu w trakcie dalszej obserwacji w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej ($p = 0,105$). W grupie badanej stężenie s-RANKL uległo wzrostowi podczas dalszej obserwacji ($p < 0,001$) i było niższe w grupie badanej w

momencie wystąpienia T1D w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,001$). Stężenie DPD w moczu również uległo zwiększeniu podczas dalszej obserwacji u pacjentów z grupy badanej ($p < 0,001$) i było wówczas wyższe niż w grupie kontrolnej ($p = 0,021$).

Biorąc pod uwagę korelacje pomiędzy markerami zaburzeń metabolizmu kostnego, a poszczególnymi parametrami przebiegu klinicznego T1D u pacjentów z grupy badanej zaobserwowano, że w momencie klinicznego rozpoznania cukrzycy stężenie metabolitu 25(OH) witaminy D ujemnie koreluje z HbA1c ($R = -0,336$, $p < 0,001$), dodatnio zaś z pH ($R = 0,351$, $p < 0,001$). Osteokalcyna w momencie wystąpienia T1D ujemnie korelowała z HbA1c ($R = -0,409$, $p < 0,001$) i w sposób dodatni zarówno z poziomem C-peptydu na czczo ($R = 0,351$, $p < 0,001$), jak i z jego stężeniem w teście stymulacji po podaży glukagonu ($R = 0,434$, $p < 0,001$), a także z pH ($R = 0,423$, $p < 0,001$). Pozytywną korelację pomiędzy stężeniem C-peptydu na czczo a stężeniem OC stwierdzono również po 7 miesiącach obserwacji ($R = 0,243$, $p = 0,014$). U pacjentów z grupy badanej na początku choroby zauważono dodatnią korelację między stężeniem osteoprotegeryny, a stężeniem HbA1c ($R = 0,288$, $p = 0,004$) oraz ujemną pomiędzy stężeniem OPG, a peptydem C na czczo ($R = -0,204$, $p = 0,046$), a także poziomem peptydu C po sześciu minutach testu z glukagonem ($R = -0,275$, $p = 0,007$), pH ($R = -0,420$, $p < 0,001$) i BMI Z-score ($R = -0,300$, $p = 0,003$). Ujemna korelacja pomiędzy poziomem OPG i BMI Z-score była również obecna w czasie follow-up ($R = -0,244$, $p = 0,009$). U pacjentów z grupy badanej występowała również ujemna korelacja między stężeniem s-RANKL i HbA1c w momencie wystąpienia choroby ($R = -0,377$, $p < 0,001$) oraz dodatnia korelacja między poziomem s-RANKL i stężeniem peptydu C na czczo ($R = 0,409$, $p < 0,001$), a także stężeniem C-peptydu po 6 minutach testu z glukagonem ($R = 0,499$, $p < 0,001$), a także BMI Z-score ($R = 0,330$, $p < 0,001$) i pH ($R = 0,565$, $p < 0,001$). Co ciekawe, po 7 miesiącach obserwacji nadal obserwowano dodatnią korelację między stężeniem s-RANKL, a stężeniem C-peptydu na czczo ($R = 0,330$, $p < 0,003$) oraz C-peptydu stymulowanego ($R = 0,269$, $p < 0,007$). W momencie wystąpienia T1D, u pacjentów stwierdzono również ujemną korelację pomiędzy HbA1c a stężeniem DPD w moczu ($R = -0,315$, $p = 0,002$). Ponadto, u dzieci z grupy badanej w momencie wystąpienia cukrzycy typu 1

parametry TBLH BMD Z-score i L1-L4 BMD Z-score w sposób dodatni korelowały z BMI Z-score (odpowiednio $R=0,392$, $p=0,001$ i $R=0,316$, $p=0,012$). W przypadku L1-L4 BMD Z-score, dodatnią korelację z BMI Z-score odnotowano również po 7-miesięcznej obserwacji ($R=0,286$, $p=0,046$). Wyrównanie metaboliczne cukrzycy po 7 miesiącach jej trwania nie miało różnicującego wpływu na stężeniu metabolitu 25(OH) witaminy D, jak i pozostałe parametry metabolizmu kostnego. Wystąpienie remisji klinicznej w przebiegu cukrzycy typu 1 nie wpływało na poziom metabolitu 25(OH) ($p=0,315$), zaobserwowano jednak związek z istotnym zmniejszeniem stężenia pyrylinksu D w moczu ($p=0,003$), a także ze wzrostem wartości TBLH-BMD Z-score ($p=0,050$).

Powyżej przedstawione wyniki potwierdzające występowanie zaburzeń metabolizmu kostnego u dzieci z cukrzycą typu 1 już w momencie rozpoznania choroby przekonują, iż warto rozważyć wprowadzenie dodatkowych badań do schematu diagnostyki tych pacjentów. W proponowanym schemacie badań, które można by rutynowo wykonywać tuż po rozpoznaniu klinicznie jawnej cukrzycy typu 1, a także po około 6 miesiącach, kiedy to ustępują już ostre zaburzenia metaboliczne należałoby uwzględnić: metabolit 25(OH) witaminy D, osteokalcynę, pyrylinks D, a także OPG i/lub s-RANKL. Z uwagi na specyfikę procesów przebudowy kości i możliwość opóźnionego ujawnienia się zaburzeń gęstości mineralnej, badanie densytometryczne należałoby przeprowadzić w przedziale czasowym pomiędzy 6, a 12 miesiącem od rozpoznania klinicznie jawnej cukrzycy typu 1.

W przypadku dzieci z cukrzycą typu 1 i niedoborem witaminy D bez zaburzeń w zakresie obrotu kostnego oraz w badaniu densytometrycznym, suplementowane dawki witaminy D powinny być zgodne z aktualnie obowiązującymi wytycznymi opracowanymi w 2018 r. przez grupę polskich ekspertów uwzględniającymi wiek oraz występowanie otyłości u dzieci i młodzieży w populacji polskiej. Jednak w sytuacji pojawienia się nieprawidłowości w zakresie obrotu kostnego wskazane byłoby rozważenie zwiększenia zalecanej dawki witaminy D, zaś w przypadku wystąpienia istotnych zmian w badaniu densytometrycznym kości sugerowane byłoby włączenie leczniczych dawek witaminy D, co miałyby zapobiec rozwojowi

trwałych zaburzeń kości. Stosowanie większych dawek witaminy D niż standardowe powinno wiązać się z regularną kontrolną poziomem metabolitu 25(OH) witaminy D. Pierwsze oznaczenie należałoby zalecić po około 4 tygodniach od rozpoczęcia suplementacji.

Wnioski:

1. U dzieci i młodzieży z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 stwierdza się niższe stężenie metabolitu witaminy D w porównaniu do dzieci z populacji ogólnej, które jednak ulega wzrostowi w trakcie pierwszych miesięcy trwania choroby, po wyrównaniu zaburzeń metabolicznych.
2. U dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 w porównaniu z grupą kontrolną stwierdza się najbardziej nasilone zaburzenia metabolizmu kostnego, mierzone stężeniem markerów obrotu kostnego oraz wykładnikami badania densytometrycznego, które ulegają stopniowej modyfikacji po kilku miesiącach przebiegu cukrzycy.
3. Poziom wyrównania metabolicznego cukrzycy typu 1 u pacjentów pediatrycznych po 7 miesiącach choroby oceniany wartością HbA1c nie wpływa różnicująco na stężenia markerów obrotu kostnego, jak i wyniki badania densytometrycznego.
4. Zaburzenia metabolizmu kostnego w pierwszym roku klinicznie jawnej cukrzycy typu 1 wydają się być najsilniej związane z przetrwałą insulinosekrecją u pediatrycznych pacjentów z cukrzycą typu 1.
5. W grupie pacjentów z częściową remisją kliniczną cukrzycy typu 1 obserwuje się niższe wartości dezoksyperydynoliny w moczu oraz wyższe wartości TBLH BMD Z-score w porównaniu do grupy pacjentów bez remisji, co może sugerować mniej nasiloną resorpcję kostną w tym okresie choroby.

ABSTRACT

Bone metabolism disorders are considered to be one of the most frequent and serious complications in children and adolescents with type 1 diabetes (T1D). The frequency of an occurrence of the complications is not clear. In current reports performed in children with several years of T1D duration it has been established that more than 50% of them have a bone mineral density deficit (BMD) in the lumbar spine. According to other publications, 57% of women and 67% of men have osteopenia and 14% of men meet the criteria for osteoporosis.

According to the currently accepted definition, WHO osteoporosis is a systemic skeletal disease characterized by a low bone mass and disorders of microarchitectural bone tissue, which cause increased bone fragility and risk of bone fracture. The criterion for diagnosis of osteoporosis in children is a decrease in mineral density by more than two standard deviations from the mean for age and sex (Z -score < -2). Osteopenia is defined as a state in which the bone mineral density is lower than the average for age and sex (Z -score between -1 and -2).

The influence of glucose metabolism on the regulation of bone metabolism is not yet fully understood. The documented pathogenetic factors of osteopenia/osteoporosis development in T1D are: insulin deficiency and insulin-like growth factor (IGF-1), hyperglycemia, metabolic acidosis, dyslipidemia, active vitamin D deficiency, increased calcium excretion in urine, lower concentration of free sex hormones, as well as coexistence of coeliac disease and other autoimmune diseases.

It should be emphasized that bone metabolism disorders are particularly severe at the time of clinical diagnosis of T1D. This is a consequence of an accompanying ketoacidosis increasing osteoclast activity, as well as of transient catabolic state caused by insulin deficiency reducing protein production and thus bone matrix proteins, bone mineralisation and osteoblast activity.

The main markers of bone turnover are osteocalcin, osteoprotegerin and its sRANKL receptor in blood serum as well as pyridoline/deoxypyridoline in

urine. Osteocalcin, a hormone produced by osteoblasts, odontoblasts and hypertrophic chondrocytes, seems to influence glucose metabolism, insulin release and insulin sensitivity stimulation. Non-carboxylated gamma-osteocalcin stimulates pancreatic β cells to insulin secretion and increases insulin sensitivity. Insulin has receptors within osteoblasts, the activation of which leads to the production of osteocalcin, therefore insulin indirectly influences the bone formation process. The combination of insulin with a receptor in osteoblasts leads to a decrease in osteoprotegerin (OPG) activity and an increase in osteoclast activity and bone resorption. Lowering the osteoprotegerin value and changing the OPG/RANKL ratio are conducive to activation of resorption. Pyridoline and deoxypyridoline are amino acids, which form cross-linking covalent bindings present only in mature forms of collagen, stabilizing the fiber structure. During bone resorption, cross-linked collagen undergoes proteolytic decomposition and the cross-linking components are released into circulation and urine.

More and more reports confirm vitamin D deficiency in patients with a newly diagnosed type 1 diabetes. The vitamin D receptor (VDR) plays an important role in the pleiotropic action of vitamin D. The proper bone mineralization process depends on vitamin D. Vitamin D interacts with various bone cell populations and takes part in the regulation between bone resorption and bone formation. Calcitriol, by combining with its receptor located on osteoblasts, activates genes encoding proteins necessary for osteoclast differentiation and bone resorption. The active form of vitamin D also regulates the expression of genes for bone matrix proteins.

The current guidelines developed in 2018 by a group of Polish experts on vitamin D dosage in children take into account age criteria and obesity. Despite more and more recent scientific reports on vitamin D deficiency in children and adolescents with a newly diagnosed type 1 diabetes, none of the existing guidelines, both the Polish Diabetes Society (PTD) and the American Diabetes Association (ADA), take into account the diagnosis of bone metabolism disorders in this group of patients. Both laboratory tests and quantitative methods are used to diagnose bone metabolism disorders in children and adolescents. In laboratory tests, the following are assessed: total

calcium and phosphorus concentration in serum and urine, alkaline phosphatase activity, liver metabolite vitamin D (25OHD) and parathormone concentration in serum. In addition, bone turnover markers are analyzed. The extraaboratory studies evaluating the bone mineral density include densitometric examination of the bone by X-ray double energy absorption (DXA) including AP spine and total body projection, considered as the gold standard of quantitative ultrasound diagnostics and quantitative ultrasound (QUS) as a helpful method.

The aims of the work:

1. Evaluation of serum concentration of 25OH vitamin D metabolite in children and adolescents with a newly diagnosed type 1 diabetes in comparison to the control group.
2. Analysis of bone metabolism markers based on biochemical bone turnover markers and quantitative studies (densitometry) in patients with a newly diagnosed type 1 diabetes in comparison to the controls.
3. Evaluation of the influence of metabolic control of diabetes after 7-months of its duration on the concentration of vitamin D metabolite 25OH and bone mineralization status in patients with type 1 diabetes.
4. Analysis of the relationship between the concentration of vitamin D metabolite 25OH and the presence of partial clinical remission in patients with type 1 diabetes.
5. To propose a scheme of diagnostics of bone metabolism disorders and management of vitamin D dosage in children with a newly diagnosed type 1 diabetes.

The study group involved 100 patients hospitalized in the Department of Pediatrics, Diabetology, Endocrinology and Nephrology of the Medical University of Łódź for a newly diagnosed type 1 diabetes according to WHO guidelines, additionally under the care of the Centre for the Treatment of Osteoporosis and Other Metabolic Bone Diseases of Children and Adolescents in Łódź, including 40 girls and 60 boys aged from 5.1 to 17.7 years. The exclusion criteria included: thyroid diseases (clinically manifest forms of hypothyroidism or hyperthyroidism), coeliac disease, obesity, low stature,

cancer, as well as accompanying respiratory or urinary system infection with significantly increased inflammation index (CRP) and vitamin D supplementation in therapeutic dose.

The evaluation of bone metabolism markers and T1D parameters was performed at two time points: during the first hospitalization at diagnosis of clinically overt T1D and after 7 (6-8) months of the diagnosis. At that time the partial clinical remission of diabetes, defined as insulin requirement <0.5 IU/kg and HbA1c $<7\%$, was also assessed. The second densitometric examination was performed between 6 and 12 months after the diagnosis of T1D.

The control group consisted of 52 patients, including 33 girls and 19 boys aged 7.2-18 years, hospitalized in the Department of Pediatrics, Diabetology, Endocrinology and Nephrology of the Medical University of Łódź, as well as in the Department of Pediatrics, Neonatal Pathology and Metabolic Bone Diseases of the Medical University of Łódź. The patients were without glucose tolerance disorders and other metabolic disorders, as well as without bone fractures in the history.

The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of Łódź (RNN/218/15/KE).

Routine laboratory tests in children and adolescents with type 1 diabetes included: HbA1c level (%), C peptide concentration (ng/ml) (fasting and after glucagon test), minimum 2 autoantibodies characteristic for type 1 diabetes (ICA, anti-GAD, anti-IA2 and ZnT8), pH, BE (mmol/l), TSH (μ IU/ml), fT3, fT4 (ng/dl), anti-TPO (IU/ml), anti-TG (IU/ml), IgA (RU/ml) and IgG (IgG) anti-tTg, DQ2/DQ8 coeliac haplotype, insulin requirement (IU/kg) and BMI Z-score.

Except for diabetic autoantibodies, other parameters of T1D clinical course were determined twice and used for the follow-up analysis of bone metabolism markers: vitamin D metabolite 25(OH), osteocalcin (OC), osteoprotegerin (OPG) and its s-RANKL receptor in blood serum, as well as urine deoxypyridinoline concentration (DPD). Densitometric examination was performed in Total Body (TBLH) and Spine (L1-L4) projections evaluating values of bone mineral density (BMD) expressed in g/cm² and Z-score index.

Results:

Analysing individual parameters of bone metabolism disorders in particular study groups, the level of metabolite 25(OH) vitamin D was lower in patients with a newly diagnosed T1D than in the control group ($p < 0.001$) and then increased in the study group after several months of observation ($p < 0.001$). There was no significant statistical difference in its level between the group of patients with type 1 diabetes during follow-up and the control group ($p = 0.563$). The lowest concentration of osteocalcin was observed in patients with T1D as compared to control group ($p < 0.001$) and then its increase was observed during follow-up ($p < 0.001$). OPG concentration in the study group was higher at the time of T1D than in the control group ($p = 0.024$) and then decreased during 7-month follow-up ($p < 0.001$), showing a tendency to lower during follow-up in the study group than in the control group ($p = 0.105$). In the study group, the concentration of s-RANKL increased during further observation ($p < 0.001$) and was lower in the study group at the time of T1D in comparison to the control group ($p < 0.001$). Urinary DPD concentration also increased during follow-up in the study group ($p < 0.001$) and was higher than in the control group ($p = 0.021$).

Taking into account correlations between markers of bone metabolism disorders and particular parameters of clinical course of T1D in patients from the study group, it was observed that at diagnosis of T1D the concentration of metabolite 25(OH) vitamin D negatively correlates with HbA1c ($R = -0.336$, $p < 0.001$) and positively with pH ($R = 0.351$, $p < 0.001$). Osteocalcin at T1D onset was negatively correlated with HbA1c ($R = -0.409$, $p < 0.001$) and positively both with fasting C-peptide level ($R = 0.351$, $p < 0.001$) and with its stimulated concentration ($R = 0.434$, $p < 0.001$) and with pH ($R = 0.423$, $p < 0.001$). Positive correlation between fasting C peptide concentration and OC concentration was also observed after 7 months of observation ($R = 0.243$, $p = 0.014$). The positive correlation between the concentration of osteoprotegerin and HbA1c ($R = 0.288$, $p = 0.004$) and the negative correlation between OPG and HbA1c ($R = -0.288$, $p = 0.004$) was observed in patients from the study group at the beginning of the disease, and also between OPG and fasting C peptide ($R = -0.204$, $p = 0.046$), as well as stimulated C peptide level ($R = -0.275$, $p = 0.007$), pH ($R = -0.420$,

$p < 0.001$) and BMI Z-score ($R = -0.300$, $p = 0.003$). Negative correlation between OPG and BMI Z-score was also present during follow-up ($R = -0.244$, $p = 0.009$). There was also a negative correlation between s-RANKL and HbA1c levels at T1D onset ($R = -0.377$, $p < 0.001$) and a positive correlation between s-RANKL levels and fasting C-peptide level ($R = 0.409$, $p < 0.001$) and C-peptide concentration after 6 minutes of glucagon test ($R = 0.499$, $p < 0.001$) as well as BMI Z-score ($R = 0.330$, $p < 0.001$) and pH ($R = 0.565$, $p < 0.001$). Interestingly, after 7 months of observation a positive correlation between the concentration of s-RANKL and fasting C-peptide ($R = 0.330$, $p < 0.003$) and stimulated C-peptide ($R = 0.269$, $p < 0.007$) was still observed. At the time of T1D, a negative correlation between HbA1c and DPD in urine was also found in patients ($R = -0.315$, $p = 0.002$). Moreover, in children with type 1 diabetes, TBLH BMD Z-score and L1-L4 BMD Z-score parameters correlated positively with BMI Z-score ($R = 0.392$, $p = 0.001$ and $R = 0.316$, $p = 0.012$, respectively). In case of L1-L4 Z-score BMD, positive correlation with BMI Z-score was also observed after 7-month observation ($R = 0.286$, $p = 0.046$). Metabolic control of diabetes after 7 months of its duration had no effect on the concentration of the metabolite 25(OH) vitamin D and other parameters of bone metabolism. The occurrence of clinical remission in T1D did not affect the level of metabolite 25(OH) ($p = 0.315$), but it was associated with a significant decrease in the concentration of DPD in urine ($p = 0.003$) and an increase in the value of TBLH-BMD Z-score ($p = 0.050$).

The above presented results confirming the occurrence of bone metabolism disorders in children with type 1 diabetes already at the time of clinical diagnosis of the disease convince that it is worth to consider the additional tests to the diagnostic scheme of these patients. The proposed schedule of tests, which could be performed routinely shortly after the diagnosis of clinically overt type 1 diabetes, and also after about 6 months, when acute metabolic disorders disappear includes: metabolite 25(OH) vitamin D, osteocalcin, pyrilin D, OPG and/or s-RANKL. Due to the specificity of bone remodeling processes and the possibility of delayed occurrence of mineral density abnormalities, densitometric study should be performed between 6 and 12 months after the diagnosis of type 1 diabetes.

In case of children with type 1 diabetes and vitamin D deficiency with no bone turnover disorders and abnormalities in densitometry examination, the supplemented doses of vitamin D should be in accordance with the current guidelines developed in 2018 by a group of Polish experts taking into account only the age and presence of obesity in children and adolescents in the general Polish population. However, in case of presence of bone turnover abnormalities, the implementation of therapeutic doses of vitamin D would be suggested to prevent the development of permanent bone disorders. The use of higher than standard doses of vitamin D should be associated with regular control of the metabolite level of 25(OH) vitamin D. The first evaluation should be recommended after about 4 weeks from the start of supplementation.

Conclusions:

1. In children and adolescents with a newly diagnosed type 1 diabetes, a lower concentration of vitamin D metabolite is observed in comparison to children from the general population, but it increases during the first months of the disease, after correction of metabolic disorders.
2. In children with a newly diagnosed type 1 diabetes, the most severe bone metabolism disturbances measured by the concentrations of bone turnover markers and densitometric parameters are observed in comparison to the control group, which are gradually modified after a few months of diabetes duration.
3. Metabolic control of type 1 diabetes assessed by HbA1c level in pediatric patients after 7 months of the disease duration does not have a differentiating effect on the concentrations of bone turnover markers or on the results of densitometry.

4. Bone metabolism disturbances in the first year of clinically overt type 1 diabetes seem to be the most strongly associated with the persistent insulin secretion in pediatric patients with type 1 diabetes.

5. In the group of patients with a partial clinical remission of type 1 diabetes, a lower urinary deoxypyridinoline and higher TBLH BMD Z-score values are observed in comparison to the group of patients with no remission, which may suggest less intensive bone resorption during this period of the disease.