

Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Wydział Lekarski

Aleksandra Pyziak-Skupień

Rozprawa doktorska: Ocena klinicznych i biochemicznych wykładników występowania częściowej remisji klinicznej w przebiegu cukrzycy typu 1 u dzieci i młodzieży.

Promotor: Dr hab. n. med. Agnieszka Zmysłowska

Klinika Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii I Katedry Pediatrii

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. n. med. Wojciech Młynarski

Zadziałanie czynnika środowiskowego u osób predysponowanych genetycznie prowadzi do zaburzeń w funkcjonowaniu układu immunologicznego i w efekcie - do autoimmunizacji wysp trzustkowych będącej przyczyną wystąpienia objawów charakterystycznych dla cukrzycy typu 1. Wkrótce po wdrożeniu insulinoterapii u pacjentów z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 obserwowany jest przejściowy okres częściowej remisji klinicznej, charakteryzujący się niewielkim zapotrzebowaniem na insulinę przy prawidłowym wyrównaniu metabolicznym. Nie bez powodu remisja kliniczna w przebiegu cukrzycy typu 1 nazywana jest miesiącem miodowym choroby a jej wystąpienie wiązane jest z mniejszą częstością zarówno ostrych, jak i przewlekłych powikłań w przebiegu choroby. Liczne badania koncentrują się nawet na próbach farmakologicznego przedłużenia tego niezwykle korzystnego z punktu widzenia pacjenta okresu choroby. Warunkiem występowania remisji klinicznej w przebiegu cukrzycy typu 1 jest zmniejszenie toksycznego wpływu hiperglikemii na komórki β , skutkujące poprawą zarówno insulinosekrecji, jak i wrażliwości tkanek obwodowych na insulinę. Poszukując nowych, przydatnych klinicznie wykładników wystąpienia częściowej remisji u pacjentów z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1, warto przyjrzeć się sugerowanym czynnikiem etiologicznym leżącym u podłoża choroby, które determinują wystąpienie zaburzeń insulinosekrecji. Z drugiej strony, narastająca w populacji pediatrycznej otyłość skłania do poszukiwania wykładników występowania remisji klinicznej także wśród markerów insulinooporności.

Celem pracy była ocena częstości występowania i długości trwania częściowej remisji klinicznej w grupie badanej pacjentów pediatrycznych z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1, analiza stężenia wybranych cytokin 97 (interleukiny 1 β , interleukiny 8 oraz fetuiny A) w surowicy pacjentów z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 w porównaniu z grupą kontrolną dzieci zdrowych, ocena wpływu wieku, płci, masy urodzeniowej, występowania kwasicy ketonowej, obecności przeciwciał, stężenia peptydu C, stężenia interleukiny 1 β oraz interleukiny 8, wybranych

pośrednich wykładników insulinooporności (lipidogram, BMI) oraz stężenia fetuiny A w momencie rozpoznania cukrzycy typu 1 na wystąpienie i czas trwania częściowej remisji klinicznej, a także analiza wpływu występowania i czasu trwania częściowej remisji klinicznej na wyrównanie metaboliczne cukrzycy i przebieg kliniczny cukrzycy po dwóch latach od klinicznego rozpoznania choroby. Badaną grupę stanowiło 186 pacjentów z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1, leczonych przy użyciu insulinoterapii podskórnej. Spełnienie kryteriów częściowej remisji klinicznej oceniane było na podstawie danych klinicznych i biochemicznych, zgodnie z definicją zawartą w wytycznych ISPAD 2014, w pięciu punktach czasowych: w 3, 6, 12, 18 oraz 24 miesiącu od rozpoznania klinicznie jawnej cukrzycy. Grupę kontrolną stanowiło 47 pacjentów, bez zaburzeń tolerancji glukozy i bez innych zaburzeń metabolicznych. Częściowa remisja kliniczna definiowana była jako wartość hemoglobiny glikowanej (HbA1c) skorygowana o dawkę insuliny wynosząca <9 , oceniona zgodnie ze standardami ISPAD Guidelines 2014. Czas trwania częściowej remisji klinicznej szacowano na podstawie spełnienia kryteriów jej obecności w kolejnych, następujących po sobie punktach czasowych. Analiza danych umożliwiła podział grupy z częściową remisją kliniczną na dwie podgrupy. W podgrupie pacjentów z tzw. „krótką częściową remisją kliniczną” znaleźli się pacjenci, u których remisja obserwowana była tylko w jednym punkcie czasowym (w 3 lub 6 lub 12 lub 18 miesiącu od rozpoznania choroby). Do 98 podgrupy pacjentów z tzw. „długą częściową remisją kliniczną” kwalifikowano pacjentów, u których częściową remisję kliniczną obserwowano w co najmniej czterech następujących po sobie punktach czasowych. W grupach badanej i kontrolnej oceniono stężenie interleukiny 1 β , interleukiny 8 oraz fetuiny A w surowicy krwi przy użyciu metody ELISA. W momencie rozpoznania choroby u pacjentów w badanej grupie analizie poddano: dobowe zapotrzebowanie na insulinę, wskaźnik BMI, status dojrzewania, poziom HbA1c, stężenie peptydu C, miano przeciwciał (anty-GAD, ICA oraz ZnT8), wartość pH, BE oraz lipidogram. Ocena dobowego zapotrzebowania na insulinę, poziomu HbA1c, wskaźnika BMI dokonywana była w obserwacjach po 3, 6, 12, 18 miesiącach od rozpoznania. W obserwacji po 24 miesiącach od rozpoznania cukrzycy analiza obejmowała: wskaźnik BMI, dobowe zapotrzebowanie na insulinę, poziom HbA1c, stężenie peptydu C oraz lipidogram.

Stężenie interleukiny 1 β ($p=0,153$), interleukiny 8 ($p=0,176$) oraz fetuiny A ($p=0,428$) u pacjentów z cukrzycą typu 1 w momencie rozpoznania klinicznego choroby nie różniło się w porównaniu z populacją dzieci zdrowych. Częściowa remisja kliniczna występowała w badanej grupie u 77% pacjentów. U 42/186 (29%)

pacjentów częściowa remisja kliniczna trwała ponad 12 miesięcy. Nie obserwowano różnic w częstości występowania (72% vs. 75%; $p=0,634$) oraz czasie trwania ($p=0,594$) częściowej remisji klinicznej względem płci pacjentów. Częściowa remisja kliniczna występowała nieco częściej u młodszych pacjentów (Me 9,17 lat (IQR 5,93-12,18) vs. Me 11,48 lat (IQR 6,09-13,68); $p=0,058$). Obecność kwasicy ketonowej nie wpływała na częstość występowania częściowej remisji klinicznej choroby (79% vs. 75%; $p=0,540$), podobnie jak stężenie peptydu C (Me 0,212 ng/ml (IQR 0,120-0,404) vs. Me 0,170 ng/ml (IQR 0,141-0,373); $p=0,816$). W badanej grupie obserwowano jednak wyższe stężenie fetuiny A (Me 1,409 mg/ml (IQR 1,200-1,957) vs. Me 1,205 mg/ml (IQR 1,040-1,532); $p=0,031$) oraz interleukiny 8 (Me 9,284 pg/ml (IQR 7,146-17,448) vs. Me 7,600 pg/ml (IQR 6,000-11,377); $p=0,042$) u pacjentów, u których stwierdzono częściową remisję kliniczną choroby w porównaniu do chorych bez remisji. Masa urodzeniowa pacjentów, którzy doświadczyli częściowej remisji klinicznej była wyższa w porównaniu do masy urodzeniowej pacjentów, którzy nie mieli remisji klinicznej (Me 3450 g (IQR 3070-3750) vs. Me 3250 g (IQR 2970-3500); $p=0,021$). W modelu wieloczynnikowym na wystąpienie częściowej remisji klinicznej najsilniejszy wpływ miała wartość BMI SDS (OR = 1,675 (95% CI 1,037-2,705); $p=0,035$). Wyższa wartość BMI SDS związana była z częstszym występowaniem częściowej remisji klinicznej w przebiegu cukrzycy typu 1. Prawdopodobieństwo wystąpienia częściowej remisji klinicznej po rozpoczęciu przez pacjentów okresu dojrzewania płciowego zmniejszało się w badanej grupie ponad dwa razy (OR 0,437; 95% CI 0,215-0,892; $p=0,023$). U pacjentów, u których częściowa remisja kliniczna trwała powyżej 12 miesięcy obserwowano niższe miano przeciwciał ICA w momencie rozpoznania choroby (Me 40 JDF (IQR 0-160) vs. Me 0 JDF (IQR 0-20)). Po dwóch latach od klinicznego rozpoznania choroby pacjenci z częściową remisją kliniczną wykazywali lepsze wyrównanie metaboliczne cukrzycy mierzone wartością HbA1c (Me 6,8 % (IQR 6,2-7,5) vs. Me 7,5 % (IQR 6,9-8,3); $p=0,001$), niższe zapotrzebowanie dobowe na insulinę (Me 0,643 IU/kg (IQR 0,506-0,806) vs. Me 0,809 IU/kg (IQR 0,619-0,952); $p=0,001$) oraz wyższe stężenie peptydu C (Me 0,195 ng/ml (IQR 0,086-0,516) vs. Me 0,070 ng/ml (IQR 0,027-0,322); $p=0,029$) w porównaniu do chorych bez remisji. U pacjentów, u których obserwowano częściową remisję kliniczną stężenie cholesterolu LDL było niższe w porównaniu z podgrupą bez remisji (Me 81 mg/dl (IQR 71-93) vs. Me 92 mg/dl (IQR 75-110); $p=0,025$).

Wnioski:

1) W badanej grupie pacjentów pediatrycznych z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 obserwowano częściową remisję kliniczną u 77% chorych. U blisko 1/3 pacjentów obserwowano częściową remisją kliniczną trwającą ponad 12 miesięcy.

2) Stężenie interleukiny 1, interleukiny 8 oraz fetuiny A w surowicy krwi pacjentów z cukrzycą typu 1 w momencie rozpoznania klinicznego choroby nie różni się w porównaniu z populacją dzieci zdrowych.

3) Obecność częściowej remisji klinicznej w przebiegu cukrzycy typu 1 u dzieci i młodzieży jest związana z wyższym stężeniem fetuiny A i interleukiny 8 w momencie rozpoznania choroby.

4) Występowanie częściowej remisji klinicznej u pacjentów pediatrycznych z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 jest związane z ich statusem dojrzewania płciowego oraz wyższą masą urodzeniową, jednak najsilniejszym predyktorem obecności częściowej remisji choroby jest zachowana masa ciała w momencie klinicznego rozpoznania cukrzycy typu 1.

5) Dłuższy czas trwania częściowej remisji klinicznej w przebiegu cukrzycy typu 1 jest związany z brakiem obecności lub niższym mianem przeciwciał przeciwwyspowych ICA.

6) Obecność i dłuższy czas trwania częściowej remisji klinicznej w przebiegu cukrzycy typu 1 jest związany z lepszym wyrównaniem metabolicznym choroby, niższym zapotrzebowaniem dobowym na insulinę, zachowaną insulinosekrecją oraz lepszym profilem lipidowym po dwóch latach od rozpoznania klinicznego choroby.

In genetically predisposed individuals, the effect of the environmental factor leads to disorders in the immune system and, as a result, to pancreatic autoimmunity causing the symptoms characteristic for type 1 diabetes (T1D). Shortly after the beginning of insulin therapy in patients with newly diagnosed T1D, a transient period of partial remission is observed, characterized by low insulin requirement with normal metabolic control. The occurrence of the honeymoon phase of the disease is associated with a lower incidence of both acute and chronic complications in the course of T1D. A lot of studies focus on pharmacological therapy which prolongs this favorable period of the disease. The occurrence of partial clinical remission in the course of T1D is determined by the reduction of the hyperglycemic effect on β cells, resulting in improved insulin secretion as well as peripheral tissue sensitivity to insulin. Searching for clinically useful markers of partial clinical remission in patients with newly diagnosed T1D, the etiological factors underlying the disease should be examined. Increased number of obese patients, also in the pediatric population forces us to search for markers of clinical remission also among insulin resistance markers.

The aim of the study was to assess the frequency and duration of partial clinical remission in the pediatric patients group with newly diagnosed type 1 diabetes, analysis of concentration of selected cytokines (interleukin 1β , interleukin 8 and fetuin A) in serum of patients with newly diagnosed type 1 diabetes in comparison to a control group of healthy children, assessment of the influence of age, sex, birth weight, ketoacidosis, presence of antibodies, C-peptide concentration, interleukin 1β and interleukin 8, lipid profile, BMI and fetuin A at the time of diabetes type 1 diagnosis on the occurrence and duration of partial clinical remission, as well as the analysis of the influence of occurrence and duration of partial clinical remission on the metabolic control and clinical course of diabetes after two years of the clinical diagnosis.

The study group consisted of 186 patients with newly diagnosed T1D, treated with subcutaneous insulin therapy. Compliance with the criteria of partial clinical remission was assessed on the basis of clinical and biochemical data, as defined in the ISPAD 2014 guidelines, at five points of time: at 3, 6, 12, 18 and 24 months after the clinical diagnosis. The control group consisted of 47 patients, with no glucose tolerance and no other metabolic disorders.

Partial clinical remission was defined as the value of glycated hemoglobin (HbA_{1c}) adjusted for the insulin dose of <9 , assessed according to the ISPAD Guidelines 2014 standards. Presence the clinical remission criteria was assessed at five points

of time: at 3, 6, 12, 18 and 24 months after the clinical diagnosis of T1D. The group of patients with partial clinical remission in the course of type 1 diabetes included patients who satisfied the criteria for the presence of remission at least at one point of time. The duration of partial clinical remission was estimated based on the satisfied criteria of partial clinical remission in successive, consecutive time points. Patients were divided into two groups with "short-term" and "long-term" partial clinical remission. In the subgroup of patients with "short partial clinical remission" the clinical remission criteria was fulfilled at least in one of the time points (in 3 or 6 or 12 or 18 months after the diagnosis). In the subgroup of patients with "long-term clinical remission" the criteria of partial clinical remission was fulfilled in at least four consecutive time points.

The concentrations of interleukin 1 β , interleukin 8 and fetuin A were determined using the ELISA method in both study and control groups. At the time of diagnosis in the study group a daily insulin uptake, BMI index, 104 maturation status, HbA1c level, C peptide concentration, antibody titer (anti-GAD, ICA and ZnT8), pH, BE and lipid profile were analyzed. The assessment of daily insulin requirement, HbA1c level, BMI index was made in observations after 3, 6, 12, 18 months after diagnosis. The 24-month follow-up analysis included: BMI, daily insulin requirement, HbA1c, C-peptide and lipid profile.

Concentrations of interleukin 1 β ($p=0.153$), interleukin 8 ($p=0.176$) and fetuin A ($p=0.428$) in the patients at the time of the clinical diagnosis of T1D did not differ in comparison to the population of healthy children.

Partial clinical remission occurred in the study group in 77% of patients. In 42/186 (29%) patients, partial clinical remission lasted over 12 months. In both sexes, the prevalence (72% vs. 75%, $p=0.634$) and duration ($p=0.594$) of partial clinical remission did not differ. Partial clinical remission occurred slightly more frequently in younger patients (Me 9.17 years (IQR 5.93-12.18) vs. Me 11.48 years (IQR 6.09-13.68), $p= 0.058$). The presence of ketoacidosis did not affect the incidence of partial clinical remission (79% vs. 75%; $p = 0.540$), as well as the concentration of C peptide (Me 0.212 ng/ml (IQR 0.120-0.404) vs. Me 0.170 ng/ml (IQR 0.141-0.337); $p = 0.816$).

However, a higher concentration of fetuin A (Me 1.409 mg/ml (IQR 1.200-1.957) vs. Me 1.205 mg/ml (IQR 1.040-1.532), $p=0.031$) and interleukin 8 (Me 9.284 pg/ml (IQR 7.146-17.448) vs. Me 7.600 pg/ml (IQR 6.000- 11.377), $p = 0.042$). was observed in patients with partial clinical remission compared to patients without remission The birth weight of patients who experienced partial remission was

higher than the birth weight of patients without a clinical remission (Me 3450 g (IQR 3070-3750) vs. Me 3250 g (IQR 2970-3500), $p = 0.021$). 105

In the multifactorial model, the incidence of partial clinical remission was most strongly affected by BMI SDS (OR = 1.675 (95% CI 1.037-2.705), $p=0.035$). A higher BMI SDS value was associated with a higher incidence of partial clinical remission in the course of T1D. The probability of partial clinical remission after the patient started puberty decreased more than twice in the study group (OR 0.437; 95% CI 0.215-0.892; $p = 0.023$).

In patients with partial clinical remission lasting over 12 months, a lower titer of ICA antibodies was observed at diagnosis (Me 40 JDF (IQR 0-160) vs. Me 0 JDF (IQR 0-20)).

Two years after the clinical diagnosis, patients with partial clinical remission showed better metabolic control of diabetes measured by HbA1c (Me 6.8 % (IQR 6.2-7.5) vs. Me 7.5 % (IQR 6.9-8.3)), $p=0.001$), lower daily insulin requirement (Me 0.643 IU/kg (IQR 0.506-0.806) vs. Me 0.809 IU/kg (IQR 0.619-0.952), $p=0.001$) and higher concentration of C-peptide (Me 0.195 ng/ml (IQR 0.086-0.516) vs Me 0.070 ng/ml (IQR 0.027-0.322), $p=0.029$) compared to patients without remission. In patients in whom partial remission was observed, LDL cholesterol was lower compared to the group without remission (Me 81 mg/dl (IQR 71-93) vs. Me 92 mg/dl (IQR 75-110), $p=0.025$).

Conclusions:

1) In the group of pediatric patients with newly diagnosed type 1 diabetes, a partial clinical remission was observed in 77% of patients. In almost 1/3 of patients, a partial clinical remission lasting over 12 months was observed.

2) Concentration of interleukin 1, interleukin 8 and fetuin A in the serum of patients with type 1 diabetes at the time of clinical diagnosis is not different in comparison to the population of healthy children.

3) The presence of partial clinical remission in the course of type 1 diabetes in children and adolescents is associated with higher levels of fetuin A and interleukin 8 at diagnosis.

4) The occurrence of partial clinical remission in pediatric patients with newly diagnosed type 1 diabetes is associated with their status of sexual maturation and

higher birth weight, however, the strongest predictor of the presence of partial remission is the preserved body mass at the time of clinical diagnosis of type 1 diabetes.

5) The longer duration of partial clinical remission in the course of type 1 diabetes is associated with the absence or lower titer of ICA antibodies.

6) Presence and longer duration of partial clinical remission in the course of type 1 diabetes is associated with better metabolic control of the disease, lower daily insulin intake, preserved insulin secretion and better lipid profile two years after the diagnosis.