

Beata Małachowska

lekarz

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

**Profilowanie metabolomiczne ostrych powikłań
cukrzycy typu 1 u dzieci**

Promotor: dr hab. n. med. Wojciech Fendler prof. UM

Zakład Biostatystyki i Medycyny Translacyjnej

I Katedra Pediatrii

Łódź 2019

11. Streszczenie

11.1 Wersja polska

Wstęp: Ostre powikłania cukrzycy – kwasica ketonowa (DKA), i hipoglikemia (HG) - stanowią niebezpieczeństwo nie tylko ze względu na niosące ze sobą zagrożenie życia, ale również ze względu na długotrwałe następstwa ich przebiegu. Wyrównanie stężenia glukozy i kwasicy metabolicznej (parametrów rutynowo oznaczanych celem diagnostyki DKA i HG) nie oznacza, że wszystkie zaburzenia metaboliczne spowodowane przez te epizody zostały wyrównane.

Cel: Ocena surowiczych zmian metabolicznych wywołanych przez epizod DKA i HG, które utrzymują się pomimo wyrównania typowych parametrów laboratoryjnych zaburzonych w trakcie epizodów. Wytypowanie potencjalnych długotrwałych biomarkerów przebiegu epizodu DKA i HG.

Materiały i Metody: Cztery grupy dzieci z rozpoznaniem cukrzycy typu 1 zostały zrekrutowane do badania. Grupy badane stanowili pacjenci po epizodzie DKA oraz HG. Dodatkowo, zrekrutowano dwie grupy porównawcze – dzieci z dobrze wyrównaną cukrzycą oraz świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1 bez kwasicy ketonowej. Próbkę krwi zostały pobrane od pacjentów w trakcie hospitalizacji w trzech punktach czasowych (począwszy od przyjęcia do szpitala): 0h-24h-72h dla grupy DKA oraz NDM, a od pacjentów z grupy HG w schemacie 0h-12h-48h. Od pacjentów z grupy EDM pobrano jedną próbkę podczas rutynowo wykonywanych badań kontrolnych. Pacjentów dobrano do dwóch serii próbek: DKA-NDM-EDM (N=20x3, N=10x3, N=10) oraz HG-EDM-NDM (N=10x3, N=25, N=15x3). Wszyscy pacjenci w obrębie serii zostali dobrani pod względem płci i wieku. Metabolomiczny odcisk palca został wykonany za pomocą LC-QTOF-MS (Agilent 6550 iFunnel). Cechy metaboliczne pozostałe po usunięciu zmiennych ulegających powtarzalnej detekcji w próbkach ślepych (2/3 próbek ślepych) oraz spełniające poniższe kryteria: względne odchylenie standardowe < 0,2 w próbkach kontrolnych oraz detekcja cech w co najmniej 80% próbek z każdej grupy w każdym punkcie czasowym; zostały przeanalizowane pod kątem różnic między grupami.

Wyniki: W serii DKA, po filtrowaniu technicznym, do analizy statystycznej wytypowano 248 cech metabolicznych spośród 712 (w jonizacji pozytywnej) oraz 295 z 652 (w jonizacji negatywnej). Analiza statystyczna wytypowała 22 cechy metaboliczne jako potencjalne biomarkery przebiegu epizodu DKA utrzymujące się do 72 godzin od epizodu. Spośród nich udało się zidentyfikować 4 związki chemiczne – 3 o podniesionym poziomie po epizodzie DKA względem grup porównawczych: lizofosfatydylocholinę (LPC) (18:1), sfingomielinę (SM) (34:0), SM (d18:0/15:0) oraz jedną o obniżonym poziomie - LPC (18:0). Pomiar LPC (18:1) i SM (d18:0/15:0) został zaproponowany jako test służący do diagnostyki przebiegu epizodu DKA. Charakteryzował się on czułością wynoszącą 95% (95%CI 81,79-99,13%) i swoistością na poziomie 80% (95%CI 67,30-88,81%).

W serii HG, po filtrowaniu technicznym, do analizy statystycznej wytypowano 359 z 1006 cech z jonizacji pozytywnej oraz 374 z 763 cech z jonizacji negatywnej. Analiza statystyczna wytypowała 9 cech metabolicznych jako potencjalne biomarkery przebiegu epizodu HG

w ciągu ostatnich 48h. W serii HG udało się zidentyfikować 4 związki chemiczne – 3 o podniesionym poziomie po epizodzie HG. - dwie lizofosfatydyloetanolaminy ((LPE) (18:2) i LPE (20:3)) i LPC (18:2) oraz jedną o obniżonym poziomie - utlenioną fosfatydylocholinę (PC O-(34:3)). Pomiar stężenia LPE (20:3) i PC O-(34:3) zaproponowano jako test służący do diagnostyki przebiegu epizodu HG. Czułość tak uzyskanego testu diagnostycznego tak uzyskanego testu diagnostycznego wyniosła 90% (95%CI 72,32-97,38%) a swoistość była na poziomie 80% (95%CI 68,39-88,26%).

Wnioski: Zaburzenia metaboliczne wywołane kwasicą ketonową mogą utrzymywać się w surowicy pacjentów przez co najmniej 72 godzin od epizodu a hipoglikemią przez co najmniej 48 godzin. Pomiar LPC (18:1), SM (d18:0/15:0), LPE (20:3) i PC O-(34:3) mogłyby pomóc w diagnostyce przebiegu ostrego powikłania cukrzycy.

Słowa kluczowe: kwasica ketonowa; hipoglikemia; cukrzyca typu 1; biomarker; metabolomika

11.2 Wersja angielska

Background: Acute type 1 diabetes mellitus (T1DM) complications – diabetes ketoacidosis (DKA) and hypoglycemia (HG) – are dangerous not only as a threat to patients' life but also because of their long-standing aftermaths. Restoring normal glucose concentration and pH (parameters typically used for DKA and HG diagnosis) does not mean that all metabolic disturbances caused by those episodes are reversed.

Aim: Evaluation of serum metabolic changes caused by episode of DKA and HG, that can be detected despite restoring parameters typically changed during the episodes. Selection of putative long-standing biomarkers of past episodes of DKA and HG.

Materials and methods: Four groups of children with T1DM were recruited. Study groups composed of patients after episode of DKA and HG. Additionally, two comparative groups were recruited – children with established T1DM (EDM) and patients with newly diagnosed diabetes without diabetes ketoacidosis (NDM). Serum samples were collected in three group-specific timepoints (since the hospital admission): 0h-24h-72h for DKA and NDM group and 0h-12h-48h for HG group. From EDM patients only one sample was collected during running routine laboratory tests. Patients were assigned to two batches: DKA-NDM-EDM (N=20x3, N=10x3, N=10) and HG-EDM-NDM (N=10x3, N=25, N=15x3). All patients within the batches were matched based on age and sex. Metabolic fingerprinting was performed with LC-QTOF-MS (Agilent 6550 iFunnel). Metabolic features remaining after blank extraction (detection in 2/3 of blank samples) and fulfilling quality control criteria: relative standard deviation in QC samples <0.2 and detection in at least 80% of all timepoints samples in all groups; entered statistical analysis searching for between group differences.

Results: In DKA batch after technical filtering 248 metabolomic features out of 712 (in positive ionization) and 295 out of 652 (in negative ionization) were suitable for between-group comparisons. Statistical analysis selected 22 metabolic features as putative biomarkers of episodes of DKA occurrence in nearest 72h. From those features 4 metabolites were successfully identifies - 3 with higher after DKA episode versus comparative groups: lysophosphatidylcholine (LPC) (18:1), sphingomyeline (SM) (34:0), SM (d18:0/15:0) and one with lower level – LPC (18:0). Measurement of LPC (18:1) and SM (d18:0/15:0) were proposed as diagnostic test of past DKA episode. The test sensitivity equaling 95% (95%CI 81.79-99.13%) and specificity 80% (95%CI 67.30-88.81%).

In HG batch after technical filtering 359 metabolomic features out of 1006 (in positive ionization) and 374 out of 763 (in negative ionization) were suitable for between-group comparisons. Statistical analysis selected 9 metabolic features as putative biomarkers of episodes of DKA occurrence in nearest 48h. From those features 4 metabolites were successfully identifies - 3 with higher after HG episode versus comparative groups: two lysophosphatidylethanolamine: (LPE) (18:2) and LPE (20:3)) as well as LPC (18:2); and one with lower level in DKA group - oxy-phosphatidylcholine (PC O-(34:3)). Measurement of LPE (20:3) and PC O-(34:3) was proposed as diagnostic test of past HG episode. It was

characterized by sensitivity and specificity equaling 90% (95%CI 72.32-97.38%) and 80% (95%CI 68.39-88.26%) respectively.

Conclusions: Metabolic disturbances caused by DKA may be traced in serum up to 72h after the episode and for hypoglycemia up to 48h. Measurements of LPC (18:1), SM (d18:0/15:0), LPE (20:3) and PC O-(34:3) might be helpful in diagnostics of past acute diabetes complications.

Key words: diabetes ketoacidosis; hypoglycemia; type 1 diabetes; biomarkers; metabolomics