

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Wydział Lekarski

Lek. Marta Jankowska

**Ocena autofluorescencji skóry i jej związku z kontrolą glikemii,
markerami ryzyka sercowo-naczyniowego i powikłaniami naczyniowymi
u dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1**

Rozprawa doktorska

Promotor: dr hab. n. med. Beata Mianowska

Klinika Pediatrii, Diabetologii, Endokrynologii i Nefrologii

I Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Agnieszka Szadkowska

Łódź, 2022

10 Streszczenie

Cukrzyca typu 1 wiąże się z rozwojem powikłań przewlekłych, przede wszystkim z uszkodzeniem naczyń obejmującym zmiany w małych naczyniach krwionośnych (mikroangiopatię) i miażdżycę tętnic (makroangiopatię). Celem leczenia cukrzycy typu 1 u dzieci i młodzieży jest zapobieganie ostrym i przewlekłym powikłaniom choroby oraz osiągnięcie prawidłowego wzrostu i rozwoju dziecka przy zapewnieniu możliwie najlepszej jakości życia pacjentowi i jego opiekunom. Dzieci z cukrzycą typu 1 są objęte badaniami przesiewowymi w kierunku powikłań mikronaczyniowych (m.in. okresowa ocena wydalania albumin z moczem – albuminurii i badanie okulistyczne). Ponadto monitoruje się potencjalne ryzyko rozwoju powikłań makronaczyniowych oceniając rozwój fizyczny dzieci (również pod kątem nadwagi/otyłości), wartości ciśnienia tętniczego i stężenia lipidów we krwi oraz regularnie przeprowadza się badania przesiewowe w kierunku celiakii i autoimmunologicznego zapalenia tarczycy (w szczególności choroby Hashimoto). Hemoglobina glikowana (HbA1c) jest nadal najczęściej wykorzystywanym biomarkerem długookresowego wyrównania metabolicznego cukrzycy typu 1, dla którego udokumentowano zależności z rozwojem powikłań mikro- i makronaczyniowych. Mimo, że HbA1c ma ogromne znaczenie praktyczne, to u pojedynczych pacjentów, np. w przypadku współistnienia niektórych rodzajów niedokrwistości, parametr ten nie jest wiarygodny.

Jednym z mechanizmów uczestniczących w patogenezie przewlekłych powikłań cukrzycy (mikro-, makronaczyniowych i neuropatii) jest nadmierna produkcja końcowych produktów zaawansowanej glikacji (ang. *advanced glycationed products*, AGEs), w tym glikacja kolagenu oraz białek zawartych w tkankach i płynach ustrojowych. Ocena ich zawartości może odzwierciedlać nasilenie procesów patologicznych wtórnych do hiperglikemii. Pomiaru AGEs można dokonać w bioptacie skóry, jednak takie oznaczenie jest badaniem inwazyjnym. Wykorzystując zdolność AGEs do fluorescencji opracowano urządzenia służące do nieinwazyjnego pomiaru ich akumulacji w skórze poprzez ocenę autofluorescencji skóry (ang. *skin autofluorescence*, sAF). W opublikowanych badaniach dotyczących dorosłych pacjentów z cukrzycą typu 1 zaobserwowano, że wartości sAF odzwierciedlają wyrównanie glikemii oceniane stężeniem HbA1c i ryzyko sercowo-naczyniowe oraz wykazują korelację z obecnością powikłań mikronaczyniowych.

Dotychczasowe, stosunkowo nieliczne opublikowane dane na temat przydatności oceny sAF w ocenie ryzyka powikłań w populacji dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1, dotyczą przede wszystkim pacjentów stosunkowo długo chorujących i sugerują, że również w tej grupie wartości sAF są wyższe u osób z powikłaniami – np. z neuropatią wegetatywną lub retinopatią niż u pacjentów bez powikłań cukrzycy. Wartości sAF fizjologicznie wzrastają z wiekiem, co sugeruje, że wskazane jest określenie i korzystanie z zakresów referencyjnych sAF w zależności od wieku dla przedstawicieli różnych populacji.

Celem pracy była ocena związku sAF (i) z wyrównaniem glikemii ocenianym aktualnym i średnim wieloletnim stężeniem HbA1c, (ii) z markerami ryzyka sercowo-naczyniowego i obecnością powikłań mikronaczyniowych, (iii) z charakterystyką kliniczną dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1 (m.in. wiek, czas trwania cukrzycy, obecność chorób towarzyszących) oraz (iv) porównanie wartości sAF u młodocianych pacjentów z cukrzycą typu 1 z wartościami sAF u dzieci i młodzieży bez cukrzycy.

W badaniu uczestniczyli pacjenci w wieku 3-18 lat, chorujący na cukrzycę typu 1 co najmniej 6 miesięcy. Grupę kontrolną stanowiły dzieci i młodzież w wieku 3-18 lat bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej (z prawidłowym stężeniem HbA1c). sAF (w jednostkach arbitralnych, AU) mierzono za pomocą aparatu AGE Reader (Diagnoptics BV, Holandia). Jako klasyczne markery ryzyka sercowo-naczyniowego analizowano: stężenie cholesterolu całkowitego i jego frakcji (cholesterol LDL i HDL) oraz triglicerydów, automatyczne/ambulatoryjne zapisy ciśnienia tętniczego (ang. *ambulatory blood pressure monitoring*, ABPM; Spacelabs 90217 Monitor, Spacelabs, USA), Z-score wskaźnika masy ciała (BMI) oraz parametry składu ciała (analizator MC-980MA, TANITA, Japonia). Stężenie HbA1c oceniano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *high performance liquid chromatography*, HPLC; górna granica zakresu lokalnych wartości referencyjnych <5,7%); dla każdego pacjenta obliczono średnią z historycznych wartości HbA1c zarejestrowanych od 4. miesiąca po rozpoznaniu cukrzycy do czasu niniejszego badania (HbA1c-wieloletnia). W analizie uwzględniono również stężenie białka C-reaktywnego (CRP), kwasu moczowego i bilirubiny we krwi oraz wydalanie albumin z moczem i wynik aktualnego badania okulistycznego. Informacje na temat chorób współistniejących – celiakii i choroby Hashimoto uzyskano z dokumentacji medycznej pacjentów.

łącznie analizą objęto 348 pacjentów (182 chłopców i 166 dziewcząt, mediana wieku 14,3 lat [IQR 25-IQR 75: 11,2-17,1 lat]), dla których mediana czasu trwania cukrzycy typu 1 wynosiła 5,6 roku [3,1-8,8 lat], mediana stężeń HbA1c 7,3% [6,7-8,1%] (56 mmol/mol [50-65 mmol/mol]), mediana HbA1c-wieloletniej 7,2% [6,6-7,8%] (55,2 mmol/mol [48,6-61,7 mmol/mol]). Za pomocą pomp insulinowych było leczonych 244 pacjentów (70%), pozostali stosowali metodę funkcjonalnej insulinoterapii z użyciem wstrzykiwaczy insuliny (penów). Grupę kontrolną stanowiło 85 osób (44 chłopców i 41 dziewcząt), mediana wieku 11,0 lat [8,0-14,1 lat]), u których stężenie HbA1c wynosiło 5,1% [4,90-5,2%], sAF 1,20 AU [1,07-1,30 AU]. W grupie kontrolnej nie stwierdzono różnic pomiędzy wartościami sAF u chłopców (1,20 AU [1,07 - 1,30 AU]) i dziewcząt (1,20 AU [1,07 - 1,26], p=0,450).

W grupie badanej (pacjentów z cukrzycą typu 1) mediana sAF wynosiła 1,40 AU [1,27-1,53AU] i była większa niż w grupie kontrolnej (p = 0,004). W analizach jednoczynnikowych wykazano, że w grupie badanej wartości sAF były dodatnio skorelowane z aktualnym stężeniem HbA1c (współczynnik korelacji Spearmana $r = 0,269$, $p < 0,0001$), HbA1c-wieloletnią ($r = 0,225$, $p < 0,0001$), wiekiem ($r = 0,149$, $p = 0,005$) i czasem trwania cukrzycy ($r = 0,144$, $p = 0,007$). W grupie pacjentów z cukrzycą wartości sAF były wyższe u dziewcząt niż u chłopców (odpowiednio 1,40 AU [1,3-1,6 AU] vs 1,37 AU [1,27-1,50 AU], p=0,011) oraz u pacjentów z celiakią niż bez celiakii (1,53 AU [1,43-1,63 AU], n = 22 vs 1,40 AU [1,27-1,53 AU], n = 326; p=0,001). Ponadto wykazano dodatnie korelacje pomiędzy sAF a procentową zawartością tkanki tłuszczowej w organizmie ($r = 0,120$, $p = 0,044$), impedancją ciała (wyrażoną w Omach; $r = 0,135$, $p = 0,024$) i stężeniem CRP ($r = 0,169$, $p = 0,003$) oraz ujemną pomiędzy sAF a podstawową przemianą materii (BMR w kcal; $r = -0,156$, $p = 0,009$) i stężeniem kwasu moczowego ($r = -0,151$, $p = 0,005$). Nie stwierdzono istotnych korelacji między sAF a: stężeniami poszczególnych frakcji lipidów, wskaźnikiem Z-score-BMI, parametrami całodobowego zapisu ciśnienia tętniczego uwzględnianymi w diagnostyce zaburzeń ciśnienia tętniczego u dzieci i młodzieży (takimi jak: odsetek dziennych i nocnych odczytów ciśnienia skurczowego i rozkurczowego >95. percentyla dla płci i wzrostu oraz nocne obniżenie wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego wyrażone w procentach (status *dipping* – *non dipping*)) oraz ilością albumin wydalanych z moczem. Ponieważ przewlekłe powikłania mikronaczyniowe cukrzycy stwierdzono tylko u pojedynczych pacjentów (utrwaloną albuminurię u dwóch osób, retinopatię cukrzycową u jednej osoby,

zaćmę u dwóch osób) nie analizowano statystycznie różnic pomiędzy wartościami sAF u pacjentów z powikłaniami i bez powikłań. Wartości sAF nie różniły się pomiędzy pacjentami z towarzyszącą cukrzycy chorobą Hashimoto (n=54, 1,40 AU [1,27-1,60 AU]) a pacjentami bez choroby Hashimoto (1,40 AU [1,27-1,53 AU], p = 0,707).

W ostatecznym modelu regresji wielokrotnej potwierdzono, że parametrami niezależnie dodatnio skorelowanymi z sAF były: wiek ($\beta=0,40$, $p<0,0001$), HbA1c-wieloletnia ($\beta=0,24$, $p<0,0001$), stężenie CRP ($\beta=0,15$, $p=0,014$), płeć żeńska ($\beta=0,26$, $p=0,034$) i obecność celiakii ($\beta=0,11$, $p=0,062$); BMR ($\beta=-0,51$, $p<0,0001$) pozostała niezależnie ujemnie skorelowana z wartością sAF.

Wnioski:

1. W badanej grupie dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1 autofluorescencja skóry (sAF) dobrze odzwierciedla długookresową kontrolę glikemii ocenianą średnimi wartościami HbA1c z okresu trwania cukrzycy, co sugeruje, że pomiar sAF mógłby być wykorzystywany np. do oceny wieloletniego wyrównania cukrzycy u młodych pacjentów z cukrzycą typu 1, których wartości HbA1c z poprzednich lat nie są znane.
2. Wartości sAF nie odzwierciedlają dobrze ryzyka sercowo-naczyniowego u młodych pacjentów z cukrzycą typu 1 o względnie krótkim czasie trwania, bez współistniejących powikłań mikronaczyniowych.
3. Ponieważ wartości sAF są u dzieci z cukrzycą typu 1 wyższe niż u dzieci bez cukrzycy, można rozważyć uwzględnienie regularnych pomiarów sAF w całościowej ocenie wyrównania metabolicznego cukrzycy w populacji pediatrycznej, a dążenie do utrzymania lub osiągnięcia wartości sAF charakterystycznych dla populacji rówieśników bez cukrzycy może stanowić uzupełniający cel terapii.
4. Ujemna korelacja pomiędzy sAF a poziomem podstawowej przemiany materii (BMR) może odzwierciedlać korzystny stan metaboliczny osób z niższymi wartościami sAF, na przykład w związku z ich większą aktywnością fizyczną i większym odsetkiem beztłuszczowej masy ciała.
5. Obserwowana dodatnia korelacja pomiędzy sAF a stężeniem białka C-reaktywnego (CRP) oraz wyższe wartości sAF u osób z towarzyszącą cukrzycy typu 1 celiakią wymagają dalszych badań obejmujących liczniejszą grupę pacjentów i dłuższego czasu obserwacji.

11 Abstract

Type 1 diabetes is associated with the development of chronic complications, primarily vascular damage including changes in small blood vessels (microangiopathy) and atherosclerosis (macroangiopathy). The goal of treating type 1 diabetes in children and adolescents is to prevent acute and chronic complications of the disease and to achieve normal growth and development of the child while providing the best possible quality of life for the patient and their caregivers. Children with type 1 diabetes are screened for microvascular complications (including periodic evaluation of urinary albumin excretion - albuminuria and ophthalmologic examination). In addition, the potential risk of developing macrovascular complications is monitored by assessing children's physical development (also for overweight/obesity), blood pressure values and blood lipid levels, and moreover regular screening for celiac disease and autoimmune thyroiditis (especially Hashimoto's disease) are carried out. HbA1c (glycated hemoglobin A1c) is still the most commonly used biomarker of long-term metabolic control of type 1 diabetes, for which correlations with the development of micro- and macrovascular complications have been documented. Although HbA1c is of great practical importance, in individual patients, e.g. in case of coexistence of certain types of anemia, this parameter is not reliable.

One of the mechanisms involved in the pathogenesis of chronic diabetic complications (microvascular, macrovascular and neuropathy) is the excessive production of advanced glycation end products (AGEs), including glycation of collagen and proteins in tissues and body fluids. Assessment of their content may reflect the severity of pathological processes secondary to hyperglycemia. AGEs can be measured in a skin biopsy, but such determination is an invasive test. Taking advantage of the fluorescence ability of certain AGE molecules, devices have been developed to noninvasively measure their accumulation in the skin by assessing skin autofluorescence (sAF). In published studies in adult patients with type 1 diabetes, it has been observed that sAF values reflect glycemic control as assessed by HbA1c levels as well as cardiovascular risk, and show a correlation with the presence of microvascular complications. So far, relatively few published data on the usefulness of sAF assessment in evaluating the risk of complications in the population of children and adolescents with type 1 diabetes concern mainly patients with relatively long

disease duration and suggest that also in this group sAF values are higher in patients with complications - e.g. with autonomic neuropathy or with retinopathy than in patients without diabetic complications. Values of sAF physiologically increase with age, suggesting that it is advisable to define and use age-specific reference ranges of sAF for individuals representing different populations.

The aim of this study was to evaluate the association of sAF values (i) with glycemic control assessed by current and mean long-term HbA1c levels, (ii) with cardiovascular risk markers and with the presence of microvascular complications, (iii) with clinical characteristics of children and adolescents with type 1 diabetes (e.g., age, duration of diabetes, presence of concomitant diseases), and (iv) comparison of sAF values in paediatric patients with type 1 diabetes to sAF values in children and adolescents without diabetes.

Patients aged 3-18 years with type 1 diabetes duration of at least 6 months participated in the study. The control group consisted of children and adolescents aged 3-18 years without abnormalities of glucose metabolism (with normal HbA1c levels). sAF (in arbitrary units, AU) was measured with the AGE Reader (Diagnoptics BV, The Netherlands). As conventional markers of cardiovascular risk, total cholesterol and its fractions (LDL and HDL cholesterol), triglycerides, automated/ambulatory blood pressure monitoring (ABPM; Spacelabs 90217 Monitor, Spacelabs, USA) records, Z-score of body mass index (BMI), and body composition parameters (MC-980MA analyzer, TANITA, Japan) were analyzed. Glycated hemoglobin A1c (HbA1c) concentration was assessed by high-performance liquid chromatography (HPLC; upper limit of the local reference range <5.7%); the mean of historical HbA1c values recorded from the fourth month after diabetes diagnosis to the time of the present study (historical-HbA1c) was calculated for each patient. Blood levels of C-reactive protein (CRP), uric acid, and bilirubin were also included in the analysis, as were urinary albumin excretion and the result of a current ophthalmologic examination. Information on comorbidities - celiac disease and Hashimoto's disease was obtained from the patients' medical records.

The study group included a total of 348 patients (182 boys and 166 girls, median age 14.3 years [IQR 25-IQR 75: 11.2-17.1 years]), for whom the median duration of type 1 diabetes was 5.6 years [3.1-8.8 years], median HbA1c concentrations 7.3% [6.7-8.1%] (56 mmol/mol [50-65 mmol/mol]), median historical-HbA1c 7.2% [6.6-7.8%] (55.2 mmol/mol [48.6-61.7

mmol/mol]). 244 patients (70%) were treated with insulin pumps and the others with functional insulin therapy using insulin pen injectors. The control group consisted of 85 subjects (44 boys and 41 girls), median age 11.0 years [8.0-14.1 years]) with HbA1c levels of 5.1% [4.9-5.2%], sAF 1.20 AU [1.07-1.30 AU]. In the control group, there were no differences between sAF values in boys (1.20 AU [1.07 – 1.30 AU]) and girls (1.20 AU [1.07 – 1.26], $p=0.450$).

In the study group (patients with type 1 diabetes), the median sAF was 1.40 AU [1.27-1.53AU], which was higher than in the control group ($p = 0.004$).

Univariate analyses showed that, in the study group, sAF values were positively correlated with current HbA1c concentration (Spearman correlation coefficient $r = 0.269$, $p<0.0001$), historical-HbA1c ($r = 0.225$, $p<0.0001$), age ($r = 0.149$, $p = 0.005$) and duration of diabetes ($r = 0.144$, $p = 0.007$). Among patients with diabetes, sAF values were higher in girls than in boys (1.40 AU [1.3-1.6 AU] vs 1.37 AU [1.27-1.50 AU], respectively, $p=0.011$) and in patients with celiac disease than without celiac disease (1.53 AU [1.43-1.63 AU], $n = 22$ vs 1.40 AU [1.27-1.53 AU], $n = 326$, respectively; $p=0.001$). Furthermore, positive correlations were found between sAF and body fat percentage ($r = 0.120$, $p = 0.044$), body impedance (expressed in Ohms; $r = 0.135$, $p = 0.024$) and CRP concentration ($r = 0.169$, $p = 0.003$) and negative between sAF and basal metabolic rate (BMR in kcal; $r = -0.156$, $p = 0.009$) and uric acid concentration ($r = -0.151$, $p = 0.005$). There were no significant correlations between sAF and: concentrations of lipids' fractions, Z-score-BMI, parameters of 24-hour blood pressure monitoring considered in the diagnosis of blood pressure disorders in children and adolescents (such as: the percentage of day and night systolic and diastolic blood pressure readings >95 th percentile for sex and height and nocturnal decrease in systolic and diastolic blood pressure values expressed in percentage (status *dipping* – *non dipping*)) and the amount of albumin excreted in urine. Because chronic microvascular complications of diabetes were found in only single patients (persistent albuminuria in two patients, diabetic retinopathy in one patient, cataract in two patients), differences between sAF values in patients with and without complications were not statistically analyzed. The sAF values did not differ between patients with Hashimoto's thyroiditis ($n = 54$, 1.40 AU [1.27-1.60 AU]) and without Hashimoto's thyroiditis (1.40 AU [1.27-1.53 AU], $p = 0.707$).

The final multiple regression model confirmed that the parameters independently positively correlated with sAF were: age ($\beta=0.40$, $p<0.0001$), historical-HbA1c ($\beta=0.24$, $p<0.0001$), CRP level ($\beta=0.15$, $p=0.014$), female gender ($\beta=0.26$, $p=0.034$) and presence of celiac disease ($\beta=0.11$, $p=0.062$); BMR ($\beta=-0.51$, $p<0.0001$) remained independently negatively correlated with sAF value.

Conclusions:

1. In the study group of children and adolescents with type 1 diabetes, skin autofluorescence (sAF) reflects well the long-term glycemic control assessed by mean HbA1c values over the duration of diabetes, suggesting that sAF measurement could be used, for example, to assess long-term diabetes control in young patients with type 1 diabetes whose HbA1c values from previous years are unknown.
2. The sAF values do not reflect well the cardiovascular risk in young patients with type 1 diabetes of relatively short duration without coexisting microvascular complications.
3. Because sAF values are higher in children with type 1 diabetes than in children without diabetes, consideration may be given to including regular sAF measurements in the overall assessment of metabolic control of diabetes in the pediatric population, and striving to maintain or achieve sAF values characteristic for the peer population without diabetes may be a complementary goal of therapy.
4. The negative correlation between sAF and basal metabolic rate (BMR) may reflect the favourable metabolic status of individuals with lower sAF values, for example, due to their greater physical activity and higher percentage of lean body mass.
5. The observed positive correlation between sAF and C-reactive protein (CRP) levels and higher sAF values in subjects with type 1 diabetes and coexisting coeliac disease require further studies involving a larger group of patients and a longer follow-up-time.