

**Ocena stanu śródbłonna naczyniowego, przy użyciu innowacyjnej metody – Flow Mediated Skin Fluorescence (FMSF), opartej o fluorescencję NADH, w następstwie zmian przepływu krwi w naczyniach krwionośnych, u osób zdrowych i pacjentów z długotrwałą cukrzycą.**

**Lek. Agnieszka Łoś-Stegienta**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych



Promotor: Prof. dr hab. n. med. Katarzyna Cypryk

Promotor pomocniczy: Dr n. med. Monika Żurawska-Kliś

Wydział Nauk o Zdrowiu

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź 2022

### 3. Streszczenie pracy

#### 3.1 Streszczenie pracy w języku polskim

**Wstęp.** Cukrzyca (DM) jest grupą chorób metabolicznych charakteryzujących się hiperglikemią wynikającą z defektu wydzielania i/lub działania insuliny. Zaliczana jest do chorób cywilizacyjnych i stanowi poważny problem społeczny. Pomimo znacznego postępu w leczeniu DM, przewlekłe powikłania, nadal stanowią istotny problem kliniczny. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat dokonał się ogromny postęp w leczeniu chorych na cukrzycę, nadal jednak dużym problemem jest wysoka śmiertelność w tej grupie w porównaniu z populacją ogólną. Główną przyczyną przedwczesnego zgonu są choroby wynikające z powikłań o charakterze mikroangiopatii (dotyczących naczyń włosowatych i najdrobniejszych tętnic i żył) oraz makroangiopatii (obejmujących średnie i duże tętnice). Przy obecnym postępie wiedzy oraz dostępności metod diagnostycznych rozpoznawanie przewlekłych powikłań cukrzycy dopiero w momencie ich klinicznej manifestacji wydaje się zbyt późne. Aktualnie stosowane metody do oceny funkcji mikrokrążenia nie uzyskały powszechnej akceptacji, jako klinicznie przydatne do oceny ryzyka wystąpienia przewlekłych powikłań u chorych na DM. Dlatego też poszukuje się nowych metod diagnostycznych, które umożliwiłyby ocenę śródłonka naczyniowego i identyfikację dysfunkcji mikrokrążenia na bardzo wczesnym etapie, aby odpowiednio zakwalifikować pacjentów z DM do podjęcia szybkiej i właściwej interwencji profilaktycznej lub terapeutycznej. Kandydatem do takiej oceny jest dostępna od niedawna, nieinwazyjna metoda Flow Mediated Skin Fluorescence (FMSF) pozwalająca ocenić funkcję śródłonka w odpowiedzi na zmiany przepływu krwi w mikrokrążeniu.

**Cel.** Celem pracy była ocena przydatności klinicznej nowej metody Flow Mediated Skin Fluorescence w ocenie funkcji śródłonka i układu krążenia u pacjentów z cukrzycą bez powikłań, z cukrzycą z powikłaniami o charakterze mikro- i makronaczyniowym oraz u osób zdrowych.

**Materiał i metody.** Badanie zostało przeprowadzone w Klinice Chorób Wewnętrznych i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2018-2021. Ocenie funkcji mikrokrążenia przy użyciu metody FMSF poddano łącznie 216 osób, w tym 195 pacjentów z cukrzycą i 21 zdrowych osób. Technika FMSF mierzy zmiany intensywności fluorescencji dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADH) w skórze przedramienia w funkcji czasu, w odpowiedzi na wymuszone zatrzymanie i uwalnianie przepływu krwi. Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z instrukcją producenta (Angionica Ltd.). Początkowo przeprowadzono test FMSF-PORH test, który umożliwia nieinwazyjną ocenę krążenia mikronaczyniowego i/lub regulacji metabolicznej w oparciu o stymulację krążenia w odpowiedzi na wymuszone przekrwienie reaktywne. W teście oceniono parametry FMSF, które twórcy metody określili, jako parametry odpowiedzi hiperemicznej -  $HR_{max}$  i  $HR_{index}$  oraz ischemicznej -  $IR_{max}$  i  $IR_{index}$ . Następnie przeprowadzono FMSF-HS test, który umożliwia ocenę stanu mikrokrążenia w oparciu o analizę oscylacji spoczynkowych obserwowanych na linii bazowej i oscylacji na linii reperfuzyjnej w odpowiedzi na wymuszone przekrwienie reaktywne. Ilościowe miary rejestrowanych oscylacji zdefiniowano jako następujące parametry: FM, FM(R), HS. Oceniono również związki funkcji mikrokrążenia z kliniczną i biochemiczną charakterystyką uczestników badania. Dodatkowo oceniono również parametry: MR, RHR i  $[\log(HS)]$ . Każda osoba przed wykonaniem pierwszego badania opartego o metodę FMSF, miała wykonane badanie przy użyciu urządzenia AGEReady, oceniające zaawansowane produkty glikacji białek (AGEs).

**Prezentacja publikacji wchodzących w skład rozprawy.** Wstępem do cyklu pracy jest artykuł poglądowy pt. „Ocena mikrokrążenia u pacjentów z cukrzycą – nowa metoda diagnostyczna Flow Mediated Skin Fluorescence (FMSF)” opublikowany w *Diabetologii po dyplomie* w 2021 r. Praca ta jest zbiorem podsumowującym dotychczasowe publikacje, opisujące wykorzystanie technologii FMSF nie tylko w diabetologii, ale także w innych dziedzinach nauki, m.in. w pulmonologii, dermatologii i fizjologii sportu.

Oryginalna praca zatytułowana „*Differentiation of Diabetic Foot Ulcers Based on Stimulation of Myogenic Oscillation by Transient Ischemia*” opublikowana w czasopiśmie *Vascular Health and Risk Management* w 2021 r. ocenia zastosowanie techniki FMSF u pacjentów z cukrzycą powikłaną zespołem stopy cukrzycowej (DFU). Głównym celem badania była ocena potencjału techniki FMSF jako narzędzia do predykcji gojenia stopy cukrzycowej. Wykorzystano do tego głównie test FMSF-HS [parametry HS, FM, FM(R)] , jak również FMSF-PORH test, szczególnie parametry  $HR_{index}$  oraz  $HR_{max}$ . W niektórych przypadkach pomiary FMSF kontynuowano przez okres roku w celu monitorowania postępu choroby. Na podstawie parametru HS pacjentów podzielono na 2 grupy (grupa A obejmowała kwartył pacjentów z najwyższym parametrem HS, a grupa B obejmowała kwartył pacjentów z najniższym parametrem HS). Oceniono, że pacjenci z grupy B mają słabsze rokowanie w zakresie wygojenia owrzodzenia.

W oryginalnej pracy pt. „*Assessment of microvascular function using a novel technique Flow Mediated Skin Fluorescence (FMSF) in patients with diabetic kidney disease: A preliminary study*” opublikowanej w *Microvascular Research* w 2022 r. przedstawiono zastosowanie metody FMSF do oceny zmian fluorescencja NADPH u pacjentów z cukrzycową chorobą nerek (DKD). Pacjenci z niską reaktywną odpowiedzią na przekrwienie (parametr RHR) mieli istotnie wyższy poziom kreatyniny w surowicy (sCr) niż pacjenci z umiarkowaną i wysoką wartością RHR (odpowiednio  $p < 0,001$ ,  $p < 0,05$ ) oraz znacząco niższy szacowany współczynnik filtracji kłębuszkowej (eGFR) niż pacjenci z umiarkowanym i wysokim parametrem RHR (odpowiednio  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ). Pacjenci z bardzo niskimi i niskimi wartościami  $\log(HS)$  mieli istotnie wyższy sCr niż pacjenci z wysokim  $\log(HS)$  (odpowiednio  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ) i istotnie niższy eGFR niż pacjenci z wysokim parametrem  $\log(HS)$  (odpowiednio  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ). Pacjenci z bardzo niskim  $\log(HS)$  mieli istotnie wyższy sCr i istotnie niższy eGFR niż pacjenci z umiarkowanym (odpowiednio  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ). Średnia wartość parametru RHR była istotnie niższa u pacjentów z DKD w porównaniu, zarówno z osobami zdrowymi ( $p < 0,001$ ), jak i z podgrupą DM bez powikłań ( $p < 0,001$ ). Podobne tendencje odnotowano w przypadku średniej wartości parametru  $\log(HS)$  w podgrupie z DKD w porównaniu z osobami zdrowymi ( $p < 0,001$ ) oraz w podgrupie z cukrzycą bez powikłań ( $p < 0,001$ ). Zaobserwowaliśmy istotną odwrotną korelację między parametrem RHR a stężeniem kreatyniny w surowicy (sCr) oraz istotną dodatnią korelację z eGFR (odpowiednio  $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ ). Stwierdzono również istotne ujemne korelacje miary  $\log(HS)$  z sCr oraz istotne dodatnie korelacje z eGFR (odpowiednio  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ). Zaobserwowano również istotną odwrotną korelację między parametrami RHR i  $\log(HS)$  a zaawansowanymi produktami glikacji białek (AGEs) (odpowiednio  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ). Parametr AGEs był również istotnie wyższy u pacjentów z niskim parametrem RHR niż u pacjentów z umiarkowanym ( $p < 0,01$ ) i wysokim ( $p < 0,001$ ).

Oryginalna praca, której jestem współautorką, to „*Flow Mediated Skin Fluorescence technique reveals the remarkable effect of age on microcirculation and metabolic regulation in type 1 diabetes*” opublikowana w *Microvascular Research* w 2019 r. Przedstawia ona analizę korelacji między parametrami funkcja mikrokrążenia uzyskanymi za pomocą fluorescencji NADH ( $HR_{index}$ ,  $HR_{max}$  i MR), a wybranymi parametrami klinicznymi i antropometrycznymi u pacjentów z cukrzycą typu 1 (DM1). Parametry odpowiedzi hiperemicznej (zarówno  $HR_{index}$ , jak i  $HR_{max}$ ) były istotnie statystycznie wyższe u pacjentów w młodszej grupie wiekowej. Zaobserwowano istotną statystycznie ujemną korelację parametru  $HR_{index}$  z wiekiem ( $p < 0,005$ ) w grupie pacjentów z DM1 w przeciwieństwie do grupy kontrolnej ( $p = 0,877$ ). Osoby w grupie z DM1 miały istotnie statystycznie niższe wartości  $HR_{index}$  w stosunku do osób z grupy kontrolnej ( $p < 0,05$ ). Większość pacjentów z DM1 i  $HR_{index} < 8\%$  wykazywała

zaburzoną regulację metaboliczną.

Ostatnia praca jest listem do redakcji, którego jestem współautorką „*Flow Mediated Skin Fluorescence (FMSF) Technique for Studying Vascular Complications in Type 2 Diabetes*” opublikowanym w *Journal of Diabetes Science and Technology* w 2019 r. Artykuł ten krótko opisuje potencjał diagnostyczny metody FMSF, tym razem u pacjentów z cukrzycą typu 2 (DM2). Osoby biorące udział w badaniu podzielono na 2 podgrupy – A [pacjenci bez chorób sercowo-naczyniowych (CVD)] i B (pacjenci z CVD). Wykazano, że parametr  $HR_{index}$  różnicuje z istotnością statystyczną podgrupę B od podgrupy A. Na podstawie wartości parametru  $HR_{index}$  zidentyfikowano pacjentów z DM2 z ryzykiem związanym z wystąpieniem CVD.

## **Wnioski.**

1. Metoda Flow Mediated Skin Fluorescence jest nieinwazyjną, łatwą w wykonaniu i powszechnie dostępną techniką dla lekarzy różnych specjalności. Publikacje z różnych dziedzin nauki pokazują, że jest to obiecujące narzędzie diagnostyczne, które można wykorzystać nie tylko u pacjentów z cukrzycą.
2. Upośledzoną odpowiedź na hipoksję wywołaną przemijającym niedokrwieniem można wykorzystać do różnicowania zespołu stopy cukrzycowej i identyfikacji przypadków o niskim rokowaniu na wyleczenie.
3. Technika FMSF umożliwia identyfikację upośledzenia funkcji mikrokrążenia u pacjentów z cukrzycową chorobą nerek. Badanie potwierdza, że proste, dwuparametryczne narzędzie diagnostyczne charakteryzuje stan układu mikrokrążenia u chorych na cukrzycę z zaburzeniami czynności nerek.
4. Metoda FMSF wydaje się być użyteczną techniką monitorowania pacjentów z cukrzycą typu 1 w czasie, umożliwiającą wczesną diagnozę dysfunkcji mikrokrążenia i regulacji metabolicznej.
5. Na podstawie wstępnych wyników badań można wnioskować, że parametr  $HR_{index}$  identyfikuje pacjentów z cukrzycą typu 2 z ryzykiem związanym z chorobami sercowo-naczyniowymi.
6. Wszystkie przedstawione wyniki w publikacjach wymagają dalszych badań na większej kohorcie pacjentów. Uważam, że kolejny etap tych badań może pokazać przydatność metody FMSF do wcześniejszej diagnostyki zmian naczyniowych. Pomogłoby to w kwalifikacji pacjentów bez klinicznie jawnych powikłań naczyniowych do dalszej interwencji diagnostycznej lub terapeutycznej, która umożliwiłaby podjęcie działań zapobiegawczych.

### 3.2 Streszczenie pracy w języku angielskim

**Introduction.** Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from a defect in insulin secretion and/or function. It is classified as a civilization disease and is a serious social problem. Despite significant advances in the treatment of DM, chronic complications remain a significant clinical problem. In the last few decades, great progress has been made in the treatment of people with diabetes, but the high mortality rate in this group compared to the general population remains a big problem. The main causes of premature death are diseases resulting from complications of microangiopathy (involving the capillaries and the smallest arteries and veins) and macroangiopathy (involving medium and large arteries). With the current advances in knowledge and the availability of diagnostic methods, the diagnosis of chronic diabetes complications only at the time of their clinical manifestation seems too late. The currently used methods for the assessment of microcirculation function have not been widely accepted as clinically useful in assessing the risk of chronic complications in patients with DM. Therefore, new diagnostic methods are sought that would allow the assessment of the vascular endothelium and the identification of microcirculation dysfunction at a very early stage, to adequately qualify patients with DM for prompt and appropriate preventive or therapeutic intervention. A candidate for such an assessment is the recently available, non-invasive Flow Mediated Skin Fluorescence (FMSF) technique that allows assessing the endothelial function in response to changes in blood flow in the microcirculation.

**Objective.** The study aimed to evaluate the clinical usefulness of the novel Flow Mediated Skin Fluorescence method in the assessment of endothelial and cardiovascular function in patients with diabetes without complications, with diabetes with micro- and macrovascular complications, and in healthy subjects.

**Material and methods.** The study was conducted at the Department of Internal Diseases and Diabetology of the Medical University of Lodz from 2018-2021. A total of 216 people were assessed for microcirculation using the FMSF method, including 195 diabetic patients and 21 healthy people. The FMSF technique measures changes in the intensity of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) fluorescence in the skin of the forearm as a function of time in response to the forced stoppage and release of blood flow. The test was carried out in accordance with the manufacturer's instructions (Angionica Ltd.). Initially, the FMSF-PORH test was performed, which allows a non-invasive assessment of microvascular circulation and/or metabolic regulation based on the stimulation of circulation in response to forced reactive hyperemia. The test assessed the FMSF parameters, which the authors of the method defined as the parameters of the hyperemic response -  $HR_{max}$  and  $HR_{index}$ , and the ischemic response -  $IR_{max}$  and  $IR_{index}$ . The FMSF-HS test was then performed to assess the microcirculation status based on the analysis of baseline resting oscillations and the reperfusion line oscillations in response to forced reactive hyperemia. Quantitative measures of recorded oscillations were defined as the following parameters: FM, FM (R), HS. The relationships between the microcirculation function and the clinical and biochemical characteristics of the study participants were also assessed. Additionally, the following parameters were also assessed: MR, RHR, and  $[\log(HS)]$ . Before the first FMSF-based test was performed, each person had an AGEReader test to assess advanced glycation end products (AGEs).

**Presentation of the publications that form part of the dissertation.** An introduction to the work cycle is a review article entitled „*Ocena mikrokrążenia u pacjentów z cukrzycą – nowa metoda diagnostyczna Flow Mediated Skin Fluorescence (FMSF)*” published in *Diabetologia po dyplomie* in 2021. This work is a collection summarizing previous publications, describing the use of FMSF technology not only in diabetology but also in other fields of science, incl. in pulmonology, dermatology, and sports physiology.

The original paper entitled "*Differentiation of Diabetic Foot Ulcers Based on Stimulation of Myogenic Oscillation by Transient Ischemia*" published in the journal *Vascular Health and Risk Management* in 2021 evaluates the use of the FMSF technique in patients with diabetes complicated by diabetic foot syndrome (DFU). The main aim of the study was to assess the potential of the FMSF technique as a predictive tool for the healing of a diabetic foot. Mainly the FMSF-HS test [HS, FM, FM (R) parameters] as well as the FMSF-PORH test, especially the  $HR_{index}$  and  $HR_{max}$  parameters were used. In some cases, FMSF measurements were continued over a period of one year to monitor disease progression. Based on the HS parameter, patients were divided into 2 groups (group A comprised a quartile of patients with the highest HS parameter, and group B comprised a quartile of patients with the lowest HS parameter). It was estimated that patients from group B had a poorer prognosis in terms of ulcer healing.

The original work entitled "*Assessment of microvascular function using a novel technique Flow Mediated Skin Fluorescence (FMSF) in patients with diabetic kidney disease: A preliminary study*" published in *Microvascular Research* in 2022 presents the use of the FMSF method to assess changes in NADPH fluorescence in patients with diabetic kidney disease (DKD). Patients with a low reactive hyperemia response (RHR parameter) had significantly higher serum creatinine (sCr) levels than patients with moderate and high RHR values ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,05$ , respectively) and a significantly lower estimated glomerular filtration rate (eGFR) than patients with moderate and high RHR ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ , respectively). Patients with very low and low  $\log(HS)$  values had significantly higher sCr than patients with high  $\log(HS)$  ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ , respectively) and significantly lower eGFR than patients with high  $\log(HS)$  parameters ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ , respectively). Patients with very low  $\log(HS)$  had significantly higher sCr and significantly lower eGFR than patients with moderate ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ , respectively). The mean value of the RHR parameter was significantly lower in patients with DKD compared to both healthy subjects ( $p < 0,001$ ) and the DM subgroup without complications ( $p < 0,001$ ). Similar trends were noted for the mean value of the  $\log(HS)$  parameter in the subgroup with DKD compared to healthy subjects ( $p < 0,001$ ) and in the subgroup with uncomplicated diabetes ( $p < 0,001$ ). We observed a significant inverse correlation between the RHR parameter and serum creatinine concentration (sCr) and a significant positive correlation with eGFR ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,001$ , respectively). There were also significant negative correlations of the  $\log(HS)$  measure with sCr and significant positive correlations with eGFR ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , respectively). A significant inverse correlation was also observed between the RHR and  $\log(HS)$  parameters and advanced glycation end products (AGEs) ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ , respectively). The AGEs parameter was also significantly higher in patients with low RHR parameter than in patients with moderate ( $p < 0,01$ ) and high ( $p < 0,001$ ).

The original work I am a co-author is "*Flow Mediated Skin Fluorescence technique reveals the remarkable effect of age on microcirculation and metabolic regulation in type 1 diabetes*" published in *Microvascular Research* in 2019. It presents an analysis of the correlation between the microcirculation function parameters obtained using fluorescence NADH ( $HR_{index}$ ,  $HR_{max}$ , and MR), and selected clinical and anthropometric parameters in patients with type 1 diabetes mellitus (DM1). The parameters of the hyperemic response (both  $HR_{index}$  and  $HR_{max}$ ) were statistically significantly higher in patients in the younger age group. A statistically significant negative correlation of the  $HR_{index}$  parameter with age ( $p < 0,005$ ) was observed in the group of patients with DM1 as opposed to the control group ( $p = 0,877$ ). People in the DM1 group had statistically significantly lower  $HR_{index}$  values compared to the control group ( $p < 0,05$ ). Most of the patients with DM1 and  $HR_{index} < 8\%$  showed poor metabolic regulation.

The last work is a letter to the editor, which I am co-author of the "*Flow Mediated Skin Fluorescence (FMSF) Technique for Studying Vascular Complications in Type 2 Diabetes*" published in the *Journal of Diabetes Science and Technology* in 2019. This article briefly describes the diagnostic potential of the FMSF method, including together in patients with type 2 diabetes (DM2). People participating in the study were divided into 2 subgroups - A [patients without cardiovascular diseases (CVD)] and B (patients with CVD). It was shown that the  $HR_{index}$  parameter differentiates with statistical significance subgroup B from subgroup A. Based on the value of the  $HR_{index}$  parameter, patients with DM2 at risk related to CVD were identified.

## **Conclusions.**

1. The Flow Mediated Skin Fluorescence method is a non-invasive, easy-to-perform, and widely available technique for doctors of various specialties. Publications from various fields of science show that this can be a promising diagnostic tool that can be used not only in patients with diabetes.
2. The impaired response to hypoxia-induced by transient ischemia can be used to differentiate diabetic foot syndrome and identify cases with a low prognosis for recovery.
3. The FMSF technique enables the identification of microcirculation impairment in patients with diabetic kidney disease. The study confirms that a simple, two-parameter diagnostic tool characterizes the state of the microcirculation in diabetic patients with impaired renal function.
4. The FMSF method appears to be a useful technique for monitoring diabetic patients with diabetes mellitus type 1 over time, enabling early diagnosis of microcirculation dysfunction and metabolic regulation.
5. Based on the preliminary research results, it can be concluded that the  $HR_{index}$  parameter identifies patients with type 2 diabetes at risk related to cardiovascular diseases.
6. All the results presented in the publications require further studies on a larger cohort of patients. I believe that the next stage of this research may show the usefulness of the FMSF method for the earlier diagnosis of vascular lesions. This would help qualify patients without clinically evident vascular complications for further diagnostic or therapeutic interventions that would allow for taking preventive measures.