

1. STRESZCZENIE

Cukrzyca jest problemem zdrowotnym wielu Polaków, również tych najmłodszych, a od 2006 roku zaliczana jest nawet do chorób zagrażających światowemu zdrowiu. Z kolei cukrzycowa choroba nerek (CChN) należy do jej najpoważniejszych powikłań, prowadząc do niewydolności nerek wymagającej leczenia nerkozastępczego. Priorytetem wydaje się więc wczesne wykrycie choroby, co umożliwiłoby podjęcie odpowiednich działań prewencyjnych, by zahamować jej postęp i poprawić jakość życia chorych.

Celem nadrzędnym badań była ocena stanu śródbłonna naczyń krwionośnych u dzieci z cukrzycą typu 1. (CT1) za pomocą wybranych markerów uszkodzenia śródbłonna oznaczanych w surowicy oraz wyników pomiarów autofluorescencji skórnej (SAF) przy użyciu urządzenia AGE-Reader. Wśród wspomnianych markerów znalazły się: międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna (sICAM-1), naczyniowa cząsteczka adhezyjna (sVCAM-1), selektyna E (sE-SELEKTYNA), asymetryczna dimetyloarginina (ADMA), inhibitor aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1) oraz receptory dla końcowych produktów zaawansowanej glikacji (RAGE). Badania te uzupełniono o analizę wpływu na skalę uszkodzenia śródbłonna czynników takich jak: czas trwania cukrzycy i stopień jej metabolicznego wyrównania (HbA1c), wiek pacjenta, jego płeć, stan odżywienia (BMI), czy wartość przesączania kłębuszkowego (eGFR).

Do badań zakwalifikowano 66 dzieci (36 chłopców i 30 dziewczynek) z rozpoznaniem CT1, leczonych w Klinice Endokrynologii i Diabetologii Wieku Rozwojowego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, w wieku od 5 do 18 lat (średnia $12,7 \pm 3,6$ lat). Czas trwania choroby wahał się od 0 do 14 lat (średnia $3,8 \pm 4,2$ lat). W badanej populacji wykluczono obecność innych chorób przewlekłych czy zapalnych, mogących wpływać na wyniki oznaczeń. Do grupy kontrolnej włączono 21 zdrowych dzieci (5 chłopców i 16 dziewczynek) w wieku od 5 do 16 lat (średnia $9,3 \pm 2,9$ lat), hospitalizowanych w Klinice Nefrologii Pediatrycznej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu. Wszystkie badane markery stanu zapalnego śródbłonna oznaczono, wykorzystując test immunoenzymatyczny- ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay), a dokładnie jego odmianę tzw. „sandwich” ELISA (test podwójnego wiązania). Stopień wyrównania metabolicznego cukrzycy oceniano na podstawie stężenia hemoglobiny glikowanej (HbA1c), wartość eGFR - w oparciu o stężenie kreatyniny w surowicy, podstawiając do wzoru Schwartz'a i odnosząc do odpowiednich norm, natomiast wydalanie albumin z moczem - na podstawie dobowej zbiórki moczu.

Przeprowadzone badania wykazały u pacjentów z CT1 statystycznie istotnie wyższe stężenia wszystkich ocenianych markerów (sVCAM-1, sICAM-1, sE-SELEKTYNA, PAI-1, ADMA, RAGE), podczas gdy wartości wskaźnika AF były podobne do tych z grupy kontrolnej. Wyraźny wzrost stężeń tych markerów obserwowano już na bardzo wczesnym etapie choroby, bo w momencie jej rozpoznania, podczas gdy wskaźnik stanu zapalnego w organizmie (CRP) był w zakresie normy. Zaobserwowano dodatnią liniową zależność między stężeniami oznaczanych wskaźników uszkodzenia śródbłonna i czasem trwania choroby. Innym istotnym czynnikiem postępu zmian naczyniowych okazał się wiek pacjenta. Wykazano bowiem dodatnią liniową zależność między wiekiem pacjentów a wszystkimi badanymi markerami uszkodzenia endotelium. Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w zakresie stężeń ADMA u dzieci najmłodszych w porównaniu do pacjentów w wieku pośrednim. Przemawia to za przydatnością oceny stężenia asymetrycznej dimetyloargininy w prognozowaniu wczesnych zmian w endotelium, zwłaszcza u najmłodszych pacjentów. Stwierdzono również liniową zależność między wartościami BMI pacjentów i stężeniami wszystkich badanych markerów dysfunkcji endotelium. Dzieci z cukrzycą i niedoborem masy ciała (BMI < 15centyl) prezentowali istotnie statystycznie niższe stężenia sICAM, sVCAM-1 i RAGE w stosunku do dzieci z prawidłową masą ciała, a pacjenci z nadwagą (BMI: 85 - 90centyl) wykazywali znacząco większą od prawidłowo odżywionych pacjentów albuminurię, ale nie obserwowano liniowej zależności między tymi parametrami. Wzrost stężeń markerów dysfunkcji endotelium, którym towarzyszy podwyższony wskaźnik BMI, może świadczyć o istnieniu stanu zapalnego śródbłonna w przebiegu rozwijającego się zespołu metabolicznego (otyłość jako czynnik ryzyka miażdżycy) a przecież współistnienie tych dwóch stanów zwiększa istotnie ryzyko CChN i innych powikłań angiopatycznych cukrzycy. Innym istotnym stwierdzeniem było to, że pacjenci z hiperfiltracją, mieli istotnie statystycznie niższe stężenia większości badanych markerów (sVCAM-1, sE-SELEKTYNA, ADMA i PAI-1) w porównaniu do pacjentów z prawidłowym wskaźnikiem eGFR, jednak wyższe niż grupa kontrolna. To świadczyłoby o tym, że hiperfiltracja prowadzi do zwiększonego przesączania wszystkich badanych wskaźników dysfunkcji endotelium. Poza tym eGFR korelował dodatnio ze wskaźnikiem wyrównania metabolicznego cukrzycy, tak że pacjenci z hiperfiltracją charakteryzowali się istotnie statystycznie wyższymi stężeniami hemoglobiny glikowanej. To z kolei dowodzi, że złe wyrównanie glikemii zwiększa ryzyko wystąpienia hiperfiltracji.

Poza tym, wszystkie badane markery korelowały między sobą a ich wzrastające stężenia odzwierciedlały postępujący stan zapalny endotelium. Nasilenie stanu zapalnego śródbłonna zależne

było od dobrze już poznanych czynników ryzyka powikłań naczyniowych, tj.: czasu trwania choroby, wieku pacjenta i jego BMI. Zastosowanie algorytmu Kreffta pozwoliło natomiast stworzyć model Z_{SNZZ} i określić wpływ poszczególnych parametrów na stopień nasilenia zmian zapalnych w śródbłonie. Ponieważ PAI-1, sE-SELEKTYNA i sICAM-1 charakteryzowały się najwyższymi współczynnikami korelacji ze zmienną stopnia nasilenia zmian zapalnych w śródbłonie naczyń, substancje te wydają się być dobrymi markerami uszkodzenia endotelium. Dodatkowo, w modelu tym na pierwszą pozycję wysunął się PAI-1, co nie tylko świadczy o dużej przydatności oceny tego markera w szacowaniu ryzyka powikłań naczyniowych cukrzycy, ale również wskazuje na strategiczną rolę aktywacji szlaków profibrotycznych w patogenezie tych powikłań. Wiadomo bowiem, że układ aktywatora i inhibitora plazminogenu zaangażowany jest w degradację macierzy pozakomórkowej w nerkach, przy czym inhibitor aktywatora plazminogenu 1 sprzyja włóknieniu tkanek. Skoro więc zauważono, że kontrola aktywności PAI-1 wywiera efekt przeciwfibrotyczny, marker ten jawi się jako interesujący cel terapeutyczny.

Z kolei, analizując zależności między badanymi markerami uszkodzenia śródbłonna a pozostałymi parametrami u wszystkich pacjentów (zarówno z grupy badanej jak i kontrolnej), wykazano, że wszystkie oceniane wskaźniki dysfunkcji endotelium korelowały z czynnikami ryzyka powikłań naczyniowych (BMI, wiek pacjenta, czas trwania choroby), ale tylko dwa (PAI-1 i sE-SELEKTYNA) charakteryzowały się liniowymi zależnościami ze wskaźnikiem uszkodzenia nerek (eGFR). Z tego powodu PAI-1 i sE-SELEKTYNA wydają się być bardziej przydatne w wykrywaniu wczesnych zmian w nerkach.

W przeciwieństwie do badanych markerów uszkodzenia śródbłonna wartości wskaźnika autofluorescencji (AF) nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy grupami i były niezależne od czasu trwania cukrzycy, stopnia jej metabolicznego wyrównania, wieku, płci i BMI pacjenta oraz eGFR.

Podsumowując powyższe, przeprowadzone badania pozwoliły postawić następujące wnioski:

¹U dzieci z CT1 dochodzi do stanu zapalnego śródbłonna za czym przemawia wzrost surowiczych stężeń wybranych markerów: sICAM-1, sVCAM-1, sE-SELEKTYNY, ADMA, PAI-1, RAGE.

²Dłuższy czas trwania cukrzycy, starszy wiek pacjenta, otyłość są czynnikami sprzyjającymi nasileniu zmian zapalnych śródbłonna naczyń krwionośnych. ³W modelu Z_{SNZZ} markerami mającymi największy wpływ na poziom zmian zapalnych śródbłonna naczyń krwionośnych są: PAI-1, sE-SELEKTYNA, sICAM-1.

⁴Wiodąca pozycja PAI-1 w modelu Z_{SNZZ} wskazuje na kluczową rolę aktywacji szlaków profibrotycznych w patogenezie powikłań naczyniowych cukrzycy typu 1. i

otwiera nowe perspektywy terapeutyczne. ⁵Liniowe zależności między PAI-1 i eGFR oraz między sE-SELEKTYNĄ i eGFR sugerują przewagę PAI-1 i sE-SELEKTYNY nad innymi wskaźnikami dysfunkcji śródbłonna jako czynników prognostycznych w odniesieniu do funkcji nerek u dzieci z CT1. ⁶Brak zmian w pomiarach SAF w badanej populacji świadczą o wstępnej fazie uszkodzenia śródbłonna naczyń krwionośnych w tej grupie chorych.

2. ABSTRACT

Diabetes mellitus is a health condition affecting many Poles, including the youngest population, and since 2006 it has been considered a global threat to human health. One of its most serious complications is diabetic nephropathy (DN), which leads to kidney insufficiency and requires renal replacement therapy. Therefore, early diagnosis seems to be crucial for allowing appropriate measures to be taken to prevent the disease from progressing and to significantly improve patients' quality of life.

The main purpose of the study was to evaluate the condition of vascular endothelium in children with type-1 diabetes by using selected markers of endothelial cell damage measured in serum, and to assess the results of skin autofluorescence (AF) measurements taken by the AGE-Reader. The markers included: intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1), selectin E (sE-SELECTIN), asymmetric dimethylarginine (ADMA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), and receptors for advanced glycation end products (RAGE). In addition to that, the impact of the following factors on the degree of endothelial cell damage was analyzed: duration of diabetes and the level of its metabolic control (HbA1c), patient's age, gender, BMI, and glomerular filtration rate (eGFR).

The study recruited 66 children (36 boys and 30 girls) diagnosed with type-1 diabetes mellitus, treated at the Clinic of Endocrinology and Diabetology for Children and Adolescence of Wrocław Medical University aged 5 to 18 years (average age of 12.7 ± 3.6 years). The duration of diabetes varied between 0 and 14 years (average of 3.8 ± 4.2 years). The presence of any coexisting chronic or inflammatory conditions, that could have affected the results of measurements, was excluded in all patients. The control group included 21 healthy children (5 boys and 16 girls) from 5 to 16 years of age (average age of 9.3 ± 2.9 years), hospitalized at the Clinic of Pediatric Nephrology of the University Teaching Hospital in Wrocław. All of the studied endothelial inflammation markers were assessed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); more specifically, a variant of the assay, the so-called "sandwich" ELISA (double antibody). The level of metabolic control of diabetes was assessed on the basis of glycolytic hemoglobin concentration levels (HbA1c), while eGFR was estimated on the basis of creatinine concentration in serum using the Schwartz formula and comparing the result to the applicable norms; urinary albumin excretion rate was measured in 24-hour urine collections.

The study revealed statistically significantly higher concentration levels of all of the studied markers (sVCAM-1, sICAM-1, sE-SELECTIN, PAI-1, ADMA, RAGE) in patients with type-1 diabetes, and similar AF index values in both groups (study and control). A noticeable increase in concentration of these markers was observed at a very early stage of the disease, i.e. at diagnosis, whereas the level of CRP, a marker of inflammation in the body, was within the normal range. A positive linear correlation was observed between concentration levels of the assessed endothelial damage markers and the duration of the condition. Another significant factor of the progression of vascular lesions was the patient's age, since a positive linear correlation was found between the patients' age and all of the studied markers of endothelial damage. Statistically significant differences in ADMA levels were observed in the youngest children compared to average age patients. This supports the usefulness of asymmetric dimethylarginine concentration evaluation for the purpose of the prognosis of early endothelial lesions, especially in the youngest population. There was also a linear correlation between BMI values and concentrations of all of the assessed markers of endothelial dysfunction. Diabetic children who were also underweight (BMI < 15centile) statistically presented significantly lower levels of sICAM, sVCAM-1 and RAGE compared to children with normal body weight, while obese patients (BMI: 85 – 90centile) presented with albuminuria at a significantly higher level than normally nourished patients; no linear correlation between these parameters was observed. Increased levels of endothelial dysfunction markers, accompanied by elevated BMI values, may suggest endothelial inflammation in the course of a developing metabolic syndrome (obesity as an atherosclerosis risk factor). In fact, the coexistence of these two conditions significantly increases the risk of DN and other angiopathic complications of diabetes. Another important finding was that, statistically, concentration levels of most of the studied markers (sVCAM-1, sE-SELECTIN, ADMA and PAI-1) in patients with hyperfiltration were significantly lower compared to patients with normal eGFR index, and higher compared to the control group. This could mean that hyperfiltration leads to a higher filtration rate of all of the studied markers of endothelial dysfunction. Also, eGFR was positively correlated with the index of metabolic control of diabetes, such that, statistically, the patients with hyperfiltration had significantly higher glycated hemoglobin concentrations. This, in turn, proves that poorly controlled glycaemia increases the risk of hyperfiltration.

In addition, all of the studied markers were correlated with each other, and their rising concentrations were reflected in progressing endothelial inflammation. Increased severity of endothelial inflammation corresponded to the already well-known risk factors of vascular complications, i.e. duration of the disease, patient's age and BMI. A model of endothelial

inflammation severity was established using a Krefft algorithm to determine the influence of the particular parameters on the severity of endothelial inflammation. Because the correlation coefficients of PAI-1, sE-SELECTIN and sICAM-1 with the variable of the severity of inflammation in vascular endothelium were the highest, these substances seem to be good markers of endothelial damage. Furthermore, PAI-1 came first in the model, which not only indicates that PAI-1 is a very useful marker for estimating the risk of vascular complications of diabetes, but also suggests a strategic role of profibrotic pathways activation in the pathogenesis of these complications. Indeed, plasminogen activator and inhibitor system is known to be involved in the degradation of extracellular matrix (ECM) in kidneys, whereas plasminogen activator inhibitor-1 facilitates tissue fibrosis. Since PAI-1 activity control provides antifibrotic effect, it appears to be an interesting therapeutic target.

Then, the analysis of a relationship between the studied markers of endothelial damage and the remaining parameters in all patients (control and study group) showed that all of the assessed endothelial dysfunction indexes were correlated with risk factors of vascular complications (BMI, patient's age, duration of the disease), but only two of them (PAI-1 and sE-SELECTIN) were characterized by a linear relationship with kidney damage index (eGFR). Therefore, PAI-1 and sE-SELECTIN seem to be more useful in detecting early lesions in kidneys.

Contrary to the studied markers of endothelial damage, there were no statistically significant differences in the values of autofluorescence index (AF) in both groups, and they were not related to duration of diabetes, the level of its metabolic control, age, gender or BMI of the patient, and eGFR.

Summing up, the authors arrived at the following conclusions: ¹Type-1 diabetes mellitus in children is associated with endothelial inflammation, which is supported by increased levels of selected biomarkers: sICAM-1, sVCAM-1, sE-SELECTIN, ADMA, and RAGE. ²Longer duration of diabetes, older age, and obesity are factors enhancing the severity of vascular endothelial inflammation. ³In the severity of endothelial inflammation model, the level of vascular endothelial inflammatory response was most closely associated with markers: PAI-1, sE-SELECTIN, and sICAM-1. ⁴The leading role of PAI-1 in the model of severity of endothelial inflammation indicates that profibrotic pathways activation plays a key role in the pathogenesis of vascular complications of type-1 diabetes and opens up new therapeutic perspectives. ⁵Linear relationships between PAI-1 and eGFR, and between sE-SELECTIN and eGFR suggest that PAI-1 and sE-SELECTIN have an advantage over other indexes of endothelial dysfunction as prognostic factors of kidney function in children with type-1 diabetes mellitus. ⁶The fact that SAF measurements remained the same in the study population shows an early stage of vascular endothelial damage in these patients.

