

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Diabetologii  
Wydział Lekarski II  
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. n. med. Bogna Wierusz-Wysocka

**Judyta Schlaffke**

**OCENA ZAWARTOŚCI ZAAWANSOWANYCH PRODUKTÓW  
GLIKACJI BIAŁEK W SKÓRZE METODĄ  
AUTOFLUORESCENCJI U CHORYCH NA CUKRZYCĘ TYPU 1**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Bogna Wierusz-Wysocka

Promotor pomocniczy: dr n. med. Aleksandra Araszkiewicz

Poznań 2013

*Wyrazy wdzięczności kieruję do Pani Profesor Bogny Wierusz-Wysockiej za inspirację tematyczną podjętych badań, motywację, wiarę i nieocenioną pomoc w realizacji niniejszej pracy.*

*Pani dr Aleksandrze Araszkiewicz pragnę serdecznie podziękować za życzliwość, wyrozumiałość, poświęcony czas oraz doskonałą współpracę.*

*Serdecznie dziękuję Wszystkim Współpracownikom Katedry i Kliniki  
Chorób Wewnętrznych i Diabetologii za pomoc w przygotowaniu  
rozprawy doktorskiej.*

## SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W TEKŚCIE.....	6
WSTĘP .....	9
1. Wprowadzenie .....	9
2. Cukrzyca typu 1 .....	10
2.1. Metoda intensywnej czynnościowej insulinoterapii .....	10
2.2. Etiopatogeneza mikroangiopatii cukrzycowej. Insulinooporność w cukrzycy typu 1.....	12
2.3. Zaawansowane produkty glikacji białek – rola w patogenezie powikłań i metody oceny .....	17
CEL PRACY.....	22
MATERIAŁ I METODY .....	23
1. Grupa badana .....	23
2. Badanie przedmiotowe, ocena pośrednich wykładników insulinooporności .....	24
3. Badania laboratoryjne .....	24
4. Ocena rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy o charakterze mikroangiopatii cukrzycowej.....	25
5. Ocena autofluorescencji skóry .....	27
6. Analiza statystyczna wyników .....	27
WYNIKI .....	29
1. Charakterystyka grupy badanej.....	29
2. Wyniki oceny punktów końcowych – rozwoju mikroangiopatii .....	29
3. Ocena zawartości zaawansowanych produktów glikacji białek w skórze metodą autofluorescencji w badanej grupie.....	29
4. Zależności pomiędzy autofluorescencją skóry a wyrównaniem metabolicznym cukrzycy, wykładnikami insulinooporności i innymi czynnikami charakteryzującymi klinicznie grupę badaną .....	31
5. Porównanie pacjentów z obecnością cukrzycowej choroby nerek (CChN) i bez CChN z uwzględnieniem AF skóry.....	34
6. Porównanie pacjentów z obecnością retinopatii cukrzycowej i bez retinopatii cukrzycowej z uwzględnieniem AF skóry .....	37
7. Porównanie pacjentów z obecnością neuropatii cukrzycowej i bez neuropatii cukrzycowej z uwzględnieniem AF skóry .....	40

8. Porównanie pacjentów z obecnością jakiegokolwiek mikroangiopatii cukrzycowej i bez mikroangiopatii cukrzycowej z uwzględnieniem AF skóry .	42
9. Związek pomiędzy wynikami autofluorescencji skóry a obecnością mikroangiopatii cukrzycowej.....	44
OMÓWIENIE WYNIKÓW .....	46
WNIOSKI .....	59
STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM .....	60
STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM.....	63
PIŚMIENNICTWO .....	66
SPIS TABEL I RYCIN.....	83

## WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W TEKŚCIE

<b>ACE-I</b>	inhibitory konwertazy angiotensyny
<b>AF</b>	wskaźnik autofluorescencji
<b>AGEs</b>	zaawansowane produkty glikacji białek (ang. advanced glycation end products)
<b>BMI</b>	wskaźnik masy ciała
<b>CChN</b>	cukrzycowa choroba nerek
<b>CRP</b>	białko C- reaktywne
<b>DCCT</b>	Diabetes Control and Complications Trial
<b>EDIC</b>	Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications
<b>EDC</b>	Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study
<b>eGDR</b>	oszacowany wskaźnik dystrybucji glukozy
<b>FinnDiane</b>	Finnish Diabetic Nephropathy Study
<b>eGFR</b>	oszacowany wskaźnik filtracji kłębuszkowej
<b>GLUT-2</b>	białko transportujące glukozę
<b>GSSG-GSH</b>	układ glutation-zredukowany glutation
<b>HbA1c</b>	glikowana hemoglobina
<b>HDL</b>	lipoproteiny o dużej gęstości
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	nadtlenek wodoru
<b>ICAM</b>	międzykomórkowa molekula adhezyjna
<b>IDF</b>	International Diabetes Federation
<b>IFIT</b>	intensywna czynnościowa insulinoterapia
<b>IL</b>	interleukina
<b>IQR</b>	rozstęp międzykwartyłowy

<b>IR</b>	insulinooporność
<b>IRS</b>	substrat receptora insuliny
<b>JNK</b>	kinaza białka c-Jun
<b>LDL</b>	lipoproteiny o małej gęstości
<b>LTB4</b>	leukotrien B4
<b>MAPK</b>	kinaza białkowa aktywowana mitogenem
<b>MPO</b>	mieloperoksydaza
<b>NAD</b>	dinukleotyd nikotynamido-adeninowy
<b>NADH</b>	zredukowany dinukleotyd nikotynamido-adeninowy
<b>NADP</b>	fosforan dinukleotydu nikotynamido-adeninowego
<b>NADPH</b>	zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynamido-adeninowego
<b>NCEP</b>	National Cholesterol Education Program
<b>NF<sub>k</sub>B</b>	czynnik jądrowy kappa B
<b>NO</b>	tlenek azotu
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	anion ponadtlenkowy
<b>OH<sup>•</sup></b>	rodnik hydroksylowy
<b>OR</b>	iloraz szans
<b>PAF</b>	czynnik aktywujący płytki krwi
<b>PAI-1</b>	inhibitor tkankowego aktywatora plazminogenu-1
<b>PGI<sub>2</sub></b>	prostacyklina
<b>PKC</b>	kinaza białkowa C
<b>PMN</b>	granulocyty obojętnochłonne
<b>PP</b>	ciśnienie tętna (ang. pulse pressure)
<b>RAGE</b>	receptory dla AGEs
<b>RAS</b>	rodzina kinaz protoonkogennych

<b>RR<sub>sk</sub></b>	ciśnienie tętnicze krwi skurczowe
<b>RR<sub>rozk</sub></b>	ciśnienie tętnicze krwi rozkurczowe
<b>SAF</b>	autofluorescencja skóry
<b>TCH</b>	cholesterol całkowity
<b>TG</b>	trójglicerydy
<b>TGF</b>	tkankowy czynnik wzrostu
<b>TNF</b>	czynnik martwicy guza
<b>TXA<sub>2</sub></b>	tromboksan A <sub>2</sub>
<b>UDP-GlcNAc</b>	urydynodwufosfo-N-acetylglukozamina
<b>UKPDS</b>	United Kingdom Prospective Diabetes Study
<b>VAI</b>	indeks otyłości brzusznej
<b>VCAM</b>	naczyniowa molekula adhezyjna
<b>VEGF</b>	naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu
<b>WHO</b>	Światowa Organizacja Zdrowia
<b>WHR</b>	wskaźnik talia-biodro
<b>ZM</b>	zespół metaboliczny



## **WSTĘP**

### **1. Wprowadzenie**

Cukrzyca zaliczana jest do chorób cywilizacyjnych stanowiąc istotny problem społeczny, który dotyczy aktualnie ok. 200 mln ludzi na świecie. W Polsce występuje ona u 1,5-2,0 milionów osób. Liczba zachorowań na cukrzycę stale rośnie. Według przewidywań International Diabetes Federation (IDF) w roku 2025 będzie na świecie ponad 300 milionów osób dorosłych z cukrzycą, a w 2030 r. ponad 500 mln [1,2].

Pomimo znacznego postępu w leczeniu cukrzycy, nadal przewlekłe powikłania schorzenia, zarówno o charakterze mikro- jak i makroangiopatii, stanowią istotny problem kliniczny. Prowadzą one do przedwczesnej śmierci lub ciężkiego inwalidztwa osób z cukrzycą [3-6]. Według danych epidemiologicznych ponad 60% chorych na cukrzycę typu 2 umiera o około 10 lat wcześniej niż osoby bez cukrzycy [3,4]. Młode osoby z cukrzycą typu 1 charakteryzuje 10-krotnie wyższa umieralność aniżeli w wiekowo dobranej populacji ludzi zdrowych [7]. Zasadniczą przyczyną zgonu w tej grupie chorych są choroby układu sercowo-naczyniowego rozwijające się na podłożu zmian miażdżycowych. Powikłania o charakterze mikroangiopatii są swoiste dla cukrzycy i prowadzą do zwiększonej częstości utraty wzroku oraz rozwoju schyłkowej niewydolności nerek [8].

Tradycyjne czynniki ryzyka angiopatii cukrzycowej, takie jak: hiperglikemia, dyslipidemia, czas trwania choroby, palenie papierosów, nadciśnienie tętnicze, nie w pełni tłumaczą rozwój i progresję powikłań naczyniowych cukrzycy [9,10]. Dlatego poszukuje się nowych markerów prognostycznych dla mikro- i makroangiopatii cukrzycowej.

## **2. Cukrzyca typu 1**

Cukrzyca typu 1 stanowi 10-15% wszystkich przypadków choroby. Jest ona następstwem selektywnego niszczenia komórek beta wysp trzustkowych przez proces autoimmunologiczny. Cukrzyca klinicznie ujawnia się przy destrukcji 80-90% komórek beta. Przebieg cukrzycy typu 1 zależy od tempa ich utraty. W etiopatogenezie tej choroby istotną rolę odgrywają czynniki genetyczne, związane z antygenami zgodności tkankowej (HLA) oraz czynniki środowiskowe, takie jak: infekcje wirusowe, szczepienia, niektóre składniki pokarmowe oraz stres.

### **2.1. Metoda intensywnej czynnościowej insulinoterapii**

Nie budzi już wątpliwości twierdzenie, że w rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy istotną rolę odgrywa hiperglikemia [11,12]. Badanie DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) w sposób jasny pokazało, że u chorych na cukrzycę typu 1 intensywne leczenie insuliną, pozwala ograniczyć częstość rozwoju i progresji retinopatii (odpowiednio o 76% i 54%), cukrzycowej choroby nerek (CChN) (odpowiednio o 39% i 54%) i neuropatii cukrzycowej (odpowiednio o 69% i 57%) w porównaniu z grupą osób leczonych metodą konwencjonalną [13].

W 1993 roku, po przedstawieniu wyników badań DCCT, podczas kongresu Amerykańskiego Towarzystwa Diabetologicznego uchwalono, iż intensywna insulinoterapia, umożliwiająca osiągnięcie wartości glikemii zbliżonych do wartości fizjologicznych stężeń glukozy we krwi, powinna być stosowana u większości pacjentów z cukrzycą typu 1 [14]. Okazało się bowiem, że ten rodzaj terapii jako jedyny daje możliwość pogodzenia wymagań optymalnego wyrównania metabolicznego cukrzycy z dobrą jakością życia pacjentów. Intensywna czynnościowa insulinoterapia (IFIT) jest metodą leczenia odwzorowującą fizjologiczny rytm dobowego wydzielania insuliny. Insulina egzogenna powinna zapewnić zapotrzebowanie podstawowe, wyrównać

zapotrzebowanie związane z przyjmowaniem posiłków oraz korygować ewentualne hiperglikemie ujawniające się z innych przyczyn, np. pod wpływem stresu [15,16]. Dobowa dawka insuliny w tej metodzie leczenia podzielona jest na tzw. „bazę”, podawaną celem zastąpienia podstawowego i niezależnego od posiłków wydzielania insuliny oraz zmienne dawki okołoposiłkowe, naśladujące stymulowaną węglowodanami sekrecję insuliny. Tak zwana „baza” stanowi około 40-50% dobowego zapotrzebowania na insulinę. Podstawowe stężenie insuliny uzyskuje się wstrzykując podskórnie insulinę o przedłużonym działaniu lub długodziałający analog insuliny [4,17]. Zbliżonym do optymalnego sposobem odwzorowania podstawowego wydzielania insuliny jest zastosowanie ciągłego podskórnego wlewu insuliny przy pomocy osobistej pompy insulinowej. Natomiast przed posiłkami pacjent podaje insulinę szybko działającą (preparaty szybko działające insuliny ludzkiej, analogi szybko działające insuliny) w dawce ustalonej przez pacjenta i zależnej od glikemii przed posiłkami, składu posiłku (zawartość węglowodanów), jak również planowanego wysiłku fizycznego [18]. Podstawą bezpiecznego stosowania tej metody leczenia jest programowa edukacja [19,20]. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) zaleca pięciodniowe szkolenie w warunkach specjalistycznego oddziału szpitalnego z udziałem lekarza, pielęgniarki edukacyjnej, dietetyka oraz psychologa klinicznego. Szkolenie to obejmuje ogólne wiadomości o cukrzycy, uczy chorego obliczania dawek insuliny, oraz umiejętności podejmowania decyzji w sytuacjach szczególnych. IFIT przy prawidłowym stosowaniu daje szansę na długotrwałą, dobrą kontrolę metaboliczną choroby, a tym samym na zmniejszenie ryzyka rozwoju powikłań cukrzycy [19-24].

## **2.2. Etiopatogeneza mikroangiopatii cukrzycowej. Insulinooporność w cukrzycy typu 1**

Przewlekłe powikłania cukrzycy dzielone są tradycyjnie na zmiany w małych naczyniach i mikrokrążeniu (mikroangiopatia), w naczyniach średnich i dużych (makroangiopatia) oraz w nerwach (neuropatia) [25]. Mikroangiopatia dotyczy zaburzeń czynności i struktury ściany naczyniowej tętniczek (naczynia przedwłosowate), żyłek (naczynia pozawłosowate) oraz sieci naczyń włosowatych. Zasadniczą rolę w patogenezie mikroangiopatii cukrzycowej odgrywa hiperglikemia. Pod wpływem podwyższonych stężeń glukozy we krwi zmianie ulegają własności wielu komórek, a zwłaszcza komórek śródbłonna i niektórych elementów morfotycznych krwi (granulocytów obojętnochłonnych, monocytów, płytek krwi). Obecny w tych komórkach układ białek transportujących (GLUT 2) powoduje, że transport glukozy do wnętrza komórki nie podlega ujemnej regulacji zwrotnej [26]. W rezultacie nawet niewielkie, ponadfizjologiczne stężenia glukozy we krwi, odpowiedzialne są bezpośrednio za nasilenie jej wewnątrzkomórkowego metabolizmu z zaburzeniem czynności mitochondriów [27,28].

Wśród hipotez tłumaczących mechanizmy prowadzące do rozwoju mikroangiopatii cukrzycowej nadrzędne miejsce zajmują: teoria poliolowa, teoria glikacji białek, teoria heksozaminowa oraz stresu oksydacyjnego. W warunkach hiperglikemii dochodzi zarówno do wzmożonej przemiany glukozy podstawowym torem glikolizy, jak i uruchamiane zostają dodatkowe, alternatywne szlaki metaboliczne [29-32]. Wszystkie te tory przemian glukozy, łącznie ze szlakiem glikolizy, w warunkach hiperglikemii prowadzą do zmniejszenia stosunku  $NAD^+/NADH$ , wywołując stan określany jako „metaboliczna hipoksja” [33]. Warunkuje on z kolei nasiloną produkcję wolnych rodników tlenowych i rozwój „stresu oksydacyjnego”. Stan

„metabolicznej hipoksji” pośredniczy także w zwiększonej syntezie diacyloglicerolu i aktywacji kinazy białkowej C (PKC), kluczowego enzymu przekąźnikowego [34]. Aktywacja szlaku polioliowego prowadzi do indukowanego sorbitolem „stresu osmotycznego”, do spadku aktywności Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP-azy z zaburzeniami transportu jonów, oraz do spadku stosunku NADPH/NADP. Biologiczną konsekwencją tych zaburzeń jest m.in. zmniejszona wydolność antyoksydacyjna układu glutationu, jednego z najważniejszych układów antyutleniaczy w ustroju. Z kolei stres oksydacyjny oraz aktywacja niektórych izoform kinazy białkowej C prowadzi do zmniejszenia biodostępności tlenku azotu (NO) i zwiększenia uwalniania naczyniokurczącej endoteliny 1, powodując ograniczenie przepływu krwi w obrębie mikrokrążenia prowadząc do niedotlenienia. Aktywacja kinazy białkowej C odpowiada także za stymulację kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (MAPK), odgrywającej istotną rolę m.in. w procesach proliferacji komórek. W warunkach hiperglikemii pod wpływem aktywacji PKC dochodzi również do nasilonej ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF), zwiększającego przepuszczalność naczyń i wzmagającego ich proliferację [35]. Sugeruje się także, iż aktywacja PKC warunkuje wzrost syntezy tkankowego czynnika wzrostu beta (TGFβ), fibronektyny i kolagenu IV, co prowadzi do pogrubienia błony podstawnej i rozplemu mezangium. Ponadto jest ona odpowiedzialna za nasilenie ekspresji prozakrzepowego inhibitora tkankowego aktywatora plazminogenu-1 (PAI-1) oraz prozapalnego transkrypcyjnego czynnika jądrowego kappa B (NF<sub>κ</sub>B) [36]. Zwiększona ekspresja czynnika NF<sub>κ</sub>B inicjuje w obrębie ściany naczyniowej kaskadę zjawisk typowych dla przewlekłej reakcji zapalnej [37-39].

W warunkach ponadfizjologicznych stężeń glukozy we krwi, w komórkach śródbłonka dochodzi także do nasilonej nieenzymatycznej glikacji białek. Reakcja ta

polega na łączeniu grup karbonylowych cukrów z grupami aminowymi białek, prowadząc początkowo do tworzenia wczesnych produktów glikacji (ketoamin), a następnie do formowania nieodwracalnych pośrednich i zaawansowanych produktów glikacji białek (AGEs). Proces ten zmienia budowę i funkcję białek strukturalnych, receptorowych, transportowych i enzymatycznych. Wykazano ostatnio, iż glikacja białek mitochondrialnego łańcucha oddechowego zmienia długotrwale czynność tych komórek, prowadząc do zjawiska określanego mianem „pamięci hiperglikemii” [40,41]. Zjawisku glikacji towarzyszy autooksydacja glukozy (enolizacja). W przebiegu tej reakcji, katalizowanej przez metale przejściowe (Fe, Cu), powstają toksyczne pochodne tlenu, odpowiedzialne za rozwój i nasilenie stresu oksydacyjnego. AGEs poprzez swoje receptory (RAGE) aktywują komórki śródbłonna, monocyty, makrofagi oraz komórki mezangium. Pobudzenie tych komórek prowadzi do uwalniania prozapalnych cytokin (IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6), produkcji toksycznych pochodnych tlenu oraz aktywacji czynników transkrypcyjnych [42,43].

W warunkach hiperglikemii w komórkach śródbłonna dochodzi również do aktywacji szlaku heksozoaminowego. Przy nasilonej glikolizie ten szlak przekazywania sygnału za pośrednictwem fruktozo-6-fosforanu odpowiedzialny jest za gromadzenie urydynodwufosfo-N-acetylglikozaminy (UDP-GlcNAc), a zwłaszcza jej tlenowych pochodnych. Może się ona kowalencyjnie łączyć z seryną oraz treoniną białek cytozolu i jądra komórkowego, tworząc nowy system przekaźników. W ten sposób w komórkach dochodzi do trwałych zmian struktury molekularnej. W efekcie przemiana heksozoaminowa, modyfikując czynniki transkrypcyjne, białka jądrowe, strukturalne i białka cytozolu wpływa na ekspresję genów, wzrost i podział komórek, aktywność enzymów i strukturę cytoszkieletu [36]. Aktywacja szlaku heksozoaminowego nie tylko zaburza funkcję komórek śródbłonna, lecz przede wszystkim przyczynia się do zmian

czynnościowych komórek mięśni gładkich ściany naczyniowej. Na tej drodze dochodzi zarówno do nasilonej sekrecji tkankowych czynników wzrostu ( $TGF\alpha$ ,  $TGF\beta 1$ ), prozapalnych cytokin (PAI-1), jak i do nasilonej produkcji macierzy pozakomórkowej [37].

U podłoża stresu oksydacyjnego, ujawniającego się w następstwie hiperglikemii, leży zaburzona równowaga pomiędzy produkcją a neutralizacją wysoce reaktywnych form tlenu, takich jak: aniony ponadtlenkowe ( $O_2^-$ ), nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) i rodnik hydroksylowy ( $OH^\bullet$ ). Ich nadmiar prowadzi do oksydacji i peroksydacji lipidów, fragmentacji białek, kwasów nukleinowych oraz inaktywacji niektórych enzymów. Stres oksydacyjny, indukując dysfunkcję śródbłonna, ogranicza m.in. biodostępność tlenu azotu w mechanizmie jego łączenia z produkowanymi w nadmiarze anionami ponadtlenkowymi ( $O_2^-$ ). W konsekwencji doprowadza to do nasilenia adhezji leukocytów i płytek krwi do powierzchni śródbłonna. Fizjologicznie tlenek azotu wykazuje również działanie antyproliferacyjne i przeciwzapalne. Współdziałając synergistycznie z prostacykliną ( $PGI_2$ ) hamuje także agregację płytek krwi [44,45]. W nasileniu stresu oksydacyjnego nie można pominąć roli granulocytów obojętnochłonnych (PMN). Zaliczane do komórek odpowiedzi zapalnej, stanowią pierwszą linię obrony w stosunku do obcych dla organizmu czynników. Aktywacja PMN zwiększa ich zdolność do adhezji, agregacji, migracji przez ścianę naczynia (diapedeza) oraz ukierunkowanego ruchu (chemotaksja), zapoczątkowując kaskadę zjawisk typowych dla reakcji zapalnej [46,47]. Pobudzone granulocyty stają się istotnym źródłem wysoce reaktywnych form tlenu, cytokin prozapalnych, metabolitów kwasu arachidonowego: tromboksanu  $A_2$  ( $TXA_2$ ), leukotrienu  $B_4$  ( $LTB_4$ ) oraz czynnika aktywującego płytki krwi (PAF) [48]. Pod wpływem bodźców stymulujących PMN uwalniają również białka enzymatyczne z ziarnistości lizosomalnych, między innymi

mieloperoksydazę (MPO), elastazę, katepsyny, proteinazę i lizozym [49]. Czynniki determinującymi przyleganie granulocytów obojętnochłonnych do komórek śródbłonka są cząsteczki adhezyjne. Charakterystycznymi dla PMN są należące do integryn molekuly powierzchniowe CD11b/CD18 oraz selektyna L [50]. Komplementarnymi dla nich ligandami na komórkach śródbłonka są: międzykomórkowa molekula adhezyjna- 1 (ICAM-1) i ICAM-2 dla CD11 oraz śródbłonkowa selektyna P i E dla selektyny L [51-53]. Zachodząca w warunkach podwyższonych stężeń glukozy we krwi przebudowa ściany naczyniowej, pogarsza przepływ w mikrokrążeniu wywołując hipoksję tkanek [54]. Zaburzona interakcja pomiędzy komórkami odpowiedzi zapalnej a śródbłonkiem, będąca następstwem m.in. hiperglikemii, stanowi podłoże dla rozwoju powikłań naczyniowych cukrzycy [42,55].

W ostatnim czasie duże znaczenie w zaburzeniach funkcji i struktury śródbłonka, a tym samym w etiopatogenezie przewlekłych naczyniowych powikłań cukrzycy, przypisuje się zjawisku insulinooporności (IR). Definiowane jest ono jako zmniejszona odpowiedź komórek docelowych na działanie insuliny, mimo prawidłowego a nawet zwiększonego stężenia tego hormonu. Początkowo oporność tkanek na działanie insuliny wiązano wyłącznie z otyłością i cukrzycą typu 2. Jednakże wykładniki insulinooporności można stwierdzić również u wielu pacjentów z cukrzycą typu 1. W związku z bezwzględnym niedoborem insuliny u tych chorych, metody oceny IR nie są proste i szeroko dostępne. W celu obiektywnej oceny wrażliwości tkanek na działanie insuliny u osób z typem 1 cukrzycy powinna być wykonywana kłama hiperinsulinemiczno-euglikemiczna. Jednak ze względu na koszt i czas związany z jej przeprowadzeniem, nie ma ona szerszego zastosowania w praktyce klinicznej. Dlatego też wśród pacjentów z bezwzględnym niedoborem insuliny poszukuje się innych sposobów oceny wrażliwości tkanek na działanie insuliny. W



wielu badaniach korelowano z wynikiem klamry hiperinsulinemiczno-euglikemicznej tzw. pośrednie wykładniki insulinooporności, w celu znalezienia przydatnych klinicznie, prostych metod oceny wrażliwości tkanek na działanie insuliny [56-58]. Do pośrednich wykładników IR zaliczyć można: wskaźnik masy ciała (BMI), obwód talii, wskaźnik talia-biodro (WHR), dobowe zapotrzebowanie na insulinę, stosunek stężenia TG/HDL w surowicy, oszacowany wskaźnik dystrybucji glukozy (eGDR) oraz indeks otyłości brzusznej (VAI). W wielu publikacjach w ocenie insulinooporności u osób z cukrzycą typu 1 wykorzystywana jest definicja zespołu metabolicznego (ZM). W badaniu FinnDiane (Finnish Diabetic Nephropathy Study) cechy zespołu metabolicznego wg kryterium NCEP (National Cholesterol Education Program) spełniało 38% mężczyzn i 40% kobiet. Z kolei, wśród 1337 pacjentów z badania DCCT zespół metaboliczny wg IDF stwierdzono u 22% spośród nich [59,60]. Ponadto, wszystkie trzy definicje ZM (WHO, IDF, NCEP) zostały porównane z oszacowanym wskaźnikiem dystrybucji glukozy w badaniu EDC (Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study). W cukrzycy typu 1 zespół metaboliczny występował, w zależności od definicji, od 8% (IDF) do 21% (WHO) [61]. Insulinooporność u pacjentów z cukrzycą typu 1 wydaje się być istotnym problemem klinicznym, mającym wpływ na trudności w uzyskaniu dobrego wyrównania metabolicznego oraz będącym istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju przewlekłych powikłań schorzenia [9,60,62-66].

### **2.3. Zaawansowane produkty glikacji białek – rola w patogenezie powikłań i metody oceny**

Glikacja białek w ustroju jest procesem spontanicznym, a jej nasilenie zależy od zawartości w organizmie cukrów prostych, w tym glukozy. Charakteryzuje się ona tworzeniem kowalencyjnych wiązań pomiędzy grupą aldehydową cukrów a grupą aminową białek (reakcja „brązowienia” Maillarda). Nieenzymatyczna glikacja białek

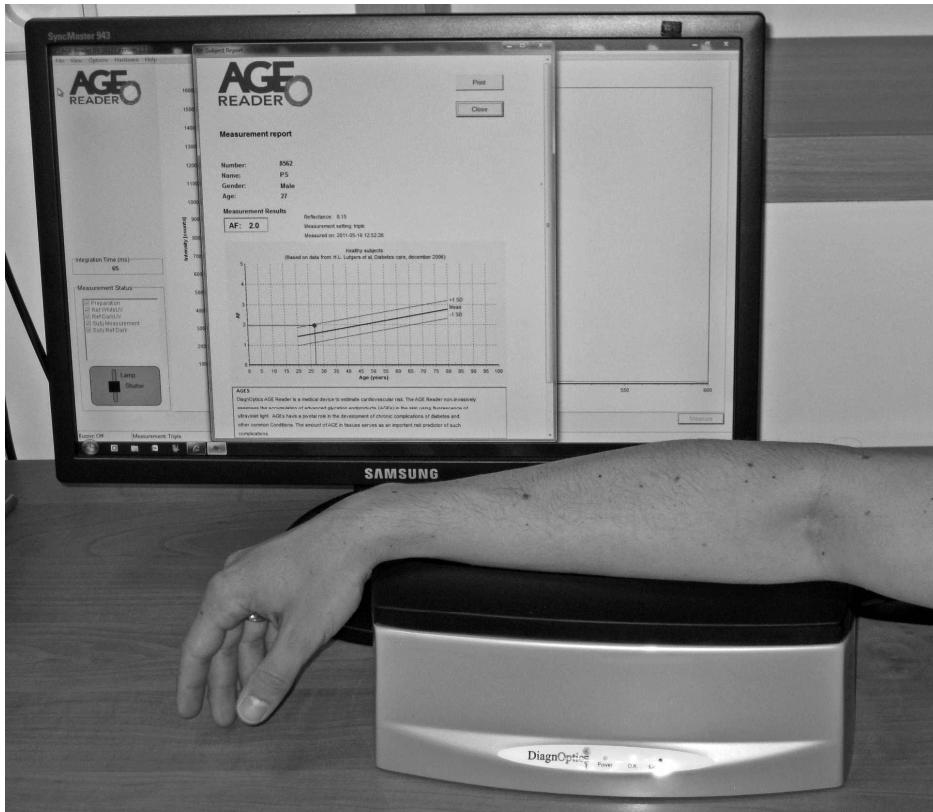
dotyczy przede wszystkim białek o wysokiej zawartości wolnych grup aminowych, czyli tych, w których strukturze znajduje się lizyna. Wczesny etap tej reakcji polega na powstaniu labilnej zasady Schiffa (aldoiminy), która szybko przekształca się do związku Amadori. Jego dalszy rozpad prowadzi z kolei do powstania dwuwęglowej pochodnej-3-deoksyglukozonu. Tworzenie dwuwęglowych (dwukarbonylowych) pochodnych może być także następstwem zachodzącej w warunkach glikacji autooksydacji glukozy do aldehydu szczawiooctowego i/lub fragmentacji glicerolo 3-fosforanu do metylglioksalu [67]. Powstałe związki są silnie reaktywne, dlatego też wchodzi w reakcje z grupami aminowymi białek tworząc zaawansowane produkty glikacji białek. Te zaś z kolei, łącząc się między sobą i z długożyjącymi białkami tworzą sieć krzyżowych powiązań, a tym samym zaburzają czynność większości komórek i tkanek ustroju. AGEs dzieli się na pre-melanoidyny, które są bezbarwne, nie fluoryzują oraz barwne melanoidyny, które fluoryzują. Do pierwszych należą glioksal, metyloglioksal, 3-deoksyglukozon oraz karboksymetylolizyna, a do drugiej grupy zaliczamy pentozydinę. AGEs po związaniu ze swoistym receptorem na powierzchni komórek zaburzają ich czynność. Obecność RAGE wykazano na powierzchni komórek śródbłonna, komórek mięśni gładkich, monocytach/makrofagach, limfocytach T, podocytach kłębków nerkowych, kardiomiocytach, komórkach dendrytycznych, neuronach centralnego i obwodowego układu nerwowego oraz komórkach transformujących [68]. Związanie AGEs ze swoistym receptorem prowadzi do tworzenia reaktywnych pochodnych tlenu, aktywacji wielu czynników transkrypcyjnych, m.in. prozapalnego czynnika NF $\kappa$ B, szlaków sygnałowych, m.in. MAPK, JNK i p21RAS [69]. W warunkach tych dochodzi również do nasilenia produkcji wielu cytokin i czynników wzrostu [70] oraz ekspresji molekuł adhezyjnych- ICAM i VCAM (naczyniowa molekula adhezyjna) [71,72]. Krzyżowe, za

pośrednictwem AGEs, wiązanie białek zwłaszcza o długim okresie życia, zaburza ich strukturę. Stają się one odporne na proteolizę, co tym samym przyspiesza proces starzenia. W następstwie glikacji kolagenu IV, będącego składową błony podstawnej, spowolniony jest jego obrót metaboliczny. Natomiast glikacja oraz krzyżowe wiązania kolagenu I i proteoglikanu powodują, że ich włókna stają się sztywne i mało elastyczne [73]. Tak więc glikacja białek błony podstawnej odpowiedzialna jest za utratę elastyczności ściany naczyniowej, zjawiska typowego dla niewyrównanej metabolicznie cukrzycy. Nieenzymatyczna glikacja białek dotyczy również krystaliny soczewki oka, powodując jej agregację i sprzyja tworzeniu zaćmy u osób chorych na cukrzycę. Proces ten doprowadza również do dezintegracji komórek śródbłonna z pozakomórkowym matriks, a tym samym do utraty powiązań między nimi a błoną wewnętrzną ściany naczyniowej. Sprzyjać to może zarówno tworzeniu blaszki miażdżycowej, jak i rozwojowi mikroangiopatii cukrzycowej.

Ocena stężenia AGEs w surowicy za pomocą biochemicznych metod enzymatycznych nie jest jednoznaczna, a na jej stabilność wpływa wiele czynników. Dlatego też nie może być ona wykorzystana w codziennej praktyce klinicznej. Sugeruje się, że bardziej wiarygodna w tym zakresie może okazać się ocena krążących w surowicy receptorów dla AGEs. W ostatnich latach pojawiły się nowe nieinwazyjne metody oceny akumulacji AGEs w skórze, opierające się na jej autofluorescencji wywołanej nagromadzeniem produktów glikacji białek. W badaniach własnych dla tych celów wykorzystuje się urządzenie AGE-Reader (DiagnOptics Technologies B.V., Holandia, typ 214D00102) (**rycina 1**). Pierwsze badania dotyczące autofluorescencji skóry (SAF) za pomocą AGE-Reader ukazały się w pierwszej dekadzie XXI wieku. Dotyczyły one początkowo pacjentów z niewydolnością nerek lub z chorobami układu sercowo-naczyniowego. Lutgers i wsp. oceniając z użyciem tej metody 973 pacjentów z

badania UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) zwrócili uwagę, że SAF w sposób wiarygodny identyfikuje osoby z cukrzycą typu 2 z wysokim ryzykiem niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych [74]. Podobnie Meerwaldt i wsp., obserwując przez okres 5 lat stosunkowo niewielkie grupy osób z typem 1 i 2 cukrzycy, stwierdzili, że nasilona autofluorescencja skóry silniej przepowiada zgony z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego aniżeli wartość HbA1c, stężenie frakcji LDL cholesterolu czy trójglicerydów (TG) w surowicy [75]. W 2011 roku pojawiła się metaanaliza Bos i wsp., ujawniająca pozytywny związek autofluorescencji skóry z rozwojem nie tylko mikroangiopatii cukrzycowej (z wyjątkiem retinopatii), lecz również makroangiopatii [76]. Autorzy zwracają jednak uwagę, że jedynie 3 badania miały charakter prospektywny. W ich opinii krótki czas trwania obserwacji oraz heterogenność analizowanych grup nie upoważniają do wysunięcia jednoznacznych wniosków. Aktualnie pojawiły się jednak wyniki pracy Mascai i wsp., w której porównywano u osób z typem 1 cukrzycy stopień SAF, ocenianej za pomocą AGE-Reader, z zawartością w skórze pośrednich i końcowych produktów glikacji białek mierzonych metodą spektrometrii. Autorzy na podstawie uzyskanych wyników wysunęli wniosek, że SAF należy uznać jako zastępczy marker ekspozycji skóry na zaawansowane produkty glikacji białek.

Łatwość obsługi AGE- Reader i powtarzalność uzyskanych wyników może zwiększyć w przyszłości możliwość wykorzystania SAF do monitorowania przebiegu cukrzycy. Autofluorescencja skóry będzie zaś traktowana jako biomarker wczesnych i późnych uszkodzeń tkankowych rozwijających się w przebiegu choroby.



**Rycina 1.** AGE-Reader (DiagnOptics Technologies B.V., Holandia)

## **CEL PRACY**

Celem pracy jest ocena przydatności klinicznej pomiaru autofluorescencji skóry wywołanej gromadzeniem się zaawansowanych produktów glikacji białek u pacjentów z cukrzycą typu 1. Postanowiono ustalić również jej związek ze stopniem wyrównania metabolicznego cukrzycy, pośrednimi wykładnikami insulinooporności i z obecnością mikroangiopatii cukrzycowej, w tym neuropatii cukrzycowej. Zamierzono również ustalić możliwy związek gromadzenia AGEs w skórze z modyfikowalnymi i niemodyfikowalnymi czynnikami ryzyka rozwoju typowych dla cukrzycy typu 1 powikłań.

## **MATERIAŁ I METODY**

### **1. Grupa badana**

Do badania włączono 608 kolejnych osób, w tym 289 mężczyzn i 319 kobiet, hospitalizowanych w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, w latach 2012-2013.

#### Kryteria włączenia stanowiły:

1. Cukrzyca typu 1 powyżej 5 lat trwania choroby
2. Wiek zachorowania na cukrzycę < 35 roku życia
3. Zgoda na udział w badaniu

Okres pięciu lat trwania schorzenia stanowił kryterium włączenia do badania, gdyż uznawany jest on za moment rozpoczęcia badań przesiewowych w kierunku naczyniowych i neuropatycznych powikłań w cukrzycy typu 1.

Wszystkie osoby, biorące udział w badaniu, zostały poinformowane o jego celu i wyraziły na nie zgodę. Program pracy przedstawiono Komisji ds. Etyki i Badań Naukowych przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu i uzyskano akceptację na jej przeprowadzenie (uchwała nr 833/2012 z dnia 13.09.2012 r.).

Pacjenci wypełnili kwestionariusz dotyczący: czasu trwania choroby, sposobu leczenia cukrzycy oraz palenia papierosów.

## 2. Badanie przedmiotowe, ocena pośrednich wykładników insulinooporności

W badanej grupie osób z typem 1 cukrzycy wykonano następujące pomiary oraz oceniono wskaźniki, które pośrednio określają wrażliwość tkanek na działanie insuliny:

- a) Dane antropometryczne: pomiar wzrostu i masy ciała z obliczeniem wskaźnika masy ciała (BMI), pomiar obwodu pasa i obwodu bioder wraz z obliczeniem wskaźnika talia-biodro (WHR) oraz pomiar ciśnienia tętniczego krwi skurczowego i rozkurczowego (dwukrotny pomiar za pomocą sfigmomanometru metodą Korotkowa, w pozycji siedzącej, po 5- minutowym odpoczynku). Wyliczono ciśnienie tętna (PP) jako różnicę pomiędzy wartością skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego krwi
- b) Dobowe zapotrzebowanie na insulinę (j/kg m. c. /dobę)
- c) Wyliczono oszacowany wskaźnik dystrybucji glukozy (eGDR) wg wzoru:  $24.31 - 12.22 (WHR) - 3.29 (\text{nadciśnienie tętnicze } 0/1) - 0.57 (\text{hemoglobina glikowana [HbA1c]})$  [mg/kg/min] [56,59]. Wartość eGDR poniżej 7.5 mg/kg/min uznano za wskaźnik zmniejszonej wrażliwości tkanek na działanie insuliny [77]
- d) Obliczono indeks otyłości brzusznej (VAI) według wzorów: u kobiet:  $\text{obwód pasa} / (36,58 + (1,89 \times \text{BMI})) \times (\text{TG} / 0,81) \times (1,52 / \text{HDL})$  i u mężczyzn:  $\text{obwód pasa} / (39,68 + (1,88 \times \text{BMI})) \times (\text{TG} / 1,03) \times (1,31 / \text{HDL})$  [78]
- e) Oznaczono parametry aterogennej dyslipidemii (stężenie w surowicy frakcji HDL cholesterolu, stężenie trójglicerydów) z obliczeniem stosunku TG/HDL.

## 3. Badania laboratoryjne

Badania laboratoryjne wykonano w Szpitalu im. F. Raszei w Poznaniu.

### Oceniono:

- a) Wartość glikowanej hemoglobiny (HbA1c) metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (norma: 4.8-6.5%)



- b) Parametry gospodarki lipidowej (stężenie cholesterolu całkowitego - TCH, frakcji HDL cholesterolu, frakcji LDL cholesterolu i trójglicerydów w surowicy) metodą standardową (normy laboratoryjne: TCH: 130-200 mg/dl; 3.3-5.2 mmol/l, HDL: M: 35-70 mg/dl; 0.9-1.8 mmol/l, HDL: K: 45-80 mg/dl; 1.1-2.0 mmol/l, LDL: 60-130 mg/dl; 1.5-3.4 mmol/l, TG: 30-150 mg/dl; 0.3-1.7 mmol/l)
- c) Stężenie białka C-reaktywnego (CRP) w surowicy wysoce czułą metodą z użyciem zestawu HITACHI 717 (norma < 5.0 mg/l)
- d) Wydalanie albumin z moczem metodą immunoturbidymetryczną: wskaźnik albumina/kreatynina (norma < 30 ug/mg kreatyniny/dobę), albuminuria (norma < 30 mg/dobę)
- e) Funkcję nerek: stężenie w surowicy kreatyniny, norma: K < 0.9 mg/dl, M < 1.2 mg/dl i obliczono oszacowany wskaźnik filtracji kłębuszkowej (eGFR) wg Modification of Diet in Renal Disease Study Equation (MDRD) norma: 90-120 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>.

#### **4. Ocena rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy o charakterze mikroangiopatii cukrzycowej**

W ocenie tzw. punktów końcowych obserwacji uwzględniono występowanie przewlekłych powikłań cukrzycy o charakterze mikroangiopatii: retinopatii, cukrzycowej choroby nerek i neuropatii cukrzycowej.

##### Ocena retinopatii cukrzycowej

Ocena oftalmoskopowa dna oka przeprowadzona była po rozszerzeniu źrenicy. Retinopatię cukrzycową rozpoznawano przy stwierdzeniu co najmniej jednego mikroaneuryzmatu w obu oczach. Zastosowano klasyfikację retinopatii cukrzycowej wg American Academy of Ophthalmology z podziałem na: retinopatię nieproliferacyjną:

łagodną, umiarkowaną i ciężką, retinopatię proliferacyjną oraz makulopatię cukrzycową [79].

#### Ocena cukrzycowej choroby nerek (CChN)

Oceny wydalania albumin z moczem dokonywano na podstawie 12-godzinnej zbiórki moczu, z równoczesnym oznaczeniem wskaźnika albumina/kreatynina w porannej porcji moczu. Za dodatnią albuminurię uznawano wydalanie albumin z moczem od 30 do 300 mg na dobę w dwóch z trzech zbiórek moczu oraz wskaźnik albumina/kreatynina > 30 mg/g w porannej próbce moczu. Cukrzycową chorobę nerek rozpoznawano u osób z patologiczną albuminurią i 10-letnim czasem trwania cukrzycy lub krótszym przy współwystępowaniu retinopatii [80]. CChN podzielono na stadia na podstawie wyniku oszacowanego wskaźnika filtracji kłębuszkowej: stadium 1 (eGFR  $\geq$  90 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>), stadium 2 (eGFR 60 – 89 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>), stadium 3 (eGFR 30-59 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>), stadium 4 (eGFR 15-29 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>) i stadium 5 (eGFR <15 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> lub leczenie dializami).

#### Ocena neuropatii cukrzycowej

Oceny neuropatii cukrzycowej dokonywano badając czucie dotyku za pomocą monofilamentu Semmesa-Weinsteina o ucisku 10g, czucie wibracji za pomocą kamertonu (128MHz) i neurotesiomietru, czucie temperatury za pomocą walca z metalową i plastikową końcówką (Tiptherm) oraz badając odruch skokowy. Cukrzycową neuropatię rozpoznawano na podstawie obecności dwóch lub więcej z czterech składowych: obecność objawów neuropatii, brak odruchu skokowego, zaburzenie czucia dotyku i/ lub wibracji.

## **5. Ocena autofluorescencji skóry**

Przeprowadzono nieinwazyjne badanie akumulacji zaawansowanych produktów glikacji białek w tkankach na podstawie poziomu autofluorescencji skóry. Pomiar wykonano z zastosowaniem urządzenia AGE-Reader (DiagnOptics Technologies B.V., Holandia, typ 214D00102). Urządzenie to posiada źródło światła promieniowania ultrafioletowego w zakresie fali 300-420nm. Wskaźnik autofluorescencji (AF) jest ilorazem średniego natężenia światła emitowanego w zakresie fali 420-600nm do średniego natężenia światła w zakresie fali 300-420nm. AF jest wyrażona w jednostkach arbitralnych i mnożona przez 100. Dla każdego pacjenta AF mierzy się trzy razy w serii, a wynik jest średnią arytmetyczną z tych ocen. Pomiar trwa 30 sekund, jest przeprowadzany w temperaturze pokojowej, na brzusznej stronie przedramienia, około 5 cm dystalnie od łokcia. Skóra musi być wolna od tatuaży, uszkodzeń oraz kosmetyków zawierających filtry UV.

## **6. Analiza statystyczna wyników**

Oceny statystycznej wyników dokonano za pomocą programu Statistica PL wersja 8.0. Normalność rozkładu wyników oceniono testem Kołmogorowa-Smirnowa z poprawką Lillieforsa. Analizowane parametry nie miały rozkładu normalnego, do dalszych analiz użyto testów nieparametrycznych. Wyniki przedstawiono jako liczebności i procenty oraz jako mediany i rozstęp międzykwartyłowy (IQR). W przypadku zmiennych numerycznych różnice pomiędzy podgrupami analizowano z zastosowaniem testu Manna-Whitney'a. Różnice w zakresie danych jakościowych oceniono testem  $\chi^2$  lub Fishera. Celem analizy powiązań zmiennych użyto testu korelacji Spearmana. Do analizy różnic w zakresie AF między grupami pacjentów w różnych stadiach CChN użyto testu ANOVA rang Kruskala-Wallisa. Zależności

pomiędzy ocenianymi danymi klinicznymi a obecnością przewlekłych powikłań cukrzycy o charakterze mikroangiopatii oceniono w modelu regresji jednoczynnikowej i wieloczynnikowej z eliminacją wpływu wieku na uzyskane wyniki. Do modelu regresji wieloczynnikowej użyto parametrów istotnych w wynikach regresji jednoczynnikowej, w oparciu o model regresji krokowej zstępującej. Za zmienne statystycznie przyjęto  $p < 0.05$ .

## **WYNIKI**

### **1. Charakterystyka grupy badanej**

Do badania włączono 608 osób, w tym 319 kobiet i 289 mężczyzn w średnim wieku 34 lata i ze średnim czasem trwania cukrzycy 14 lat. W badanej grupie 22% pacjentów paliło papierosy. U 34% osób w badanej grupie rozpoznawano nadciśnienie tętnicze, a 39% osób badanych przyjmowało preparaty inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACE-I). Dawka dobową insuliny wynosiła średnio 0.46 (0.36-0.6) j/kg m.c./dobę. Badaną grupę cechowały prawidłowe wyniki pośrednich wykładników insulinooporności. Wartość HbA1c wynosiła 7.8 (7.0-8.9)%.

Wyniki przedstawiono w **tabeli 1**.

### **2. Wyniki oceny punktów końcowych – rozwoju mikroangiopatii**

W trakcie oceny pacjentów z typem 1 cukrzycy cukrzycową chorobę nerek rozpoznawano u 106 pacjentów (17%), retinopatię cukrzycową u 270 osób (44%), w tym retinopatię nieproliferacyjną u 27% i proliferacyjną u 17% oraz neuropatię cukrzycową u 118 pacjentów (19%). Jakąkolwiek mikroangiopatię definiowaną jako obecność przynajmniej jednego z powyższych powikłań rozpoznawano u 296 pacjentów (49%). Wyniki przedstawiono w **tabeli 2**.

### **3. Ocena zawartości zaawansowanych produktów glikacji białek w skórze metodą autofluorescencji w badanej grupie**

Średnia wartość wskaźnika autofluorescencji skóry w badanej grupie wynosiła 2.3 (1.9-2.7).

**Tabela 1.** Charakterystyka kliniczna grupy badanej. Mediana (IQR), n (%).

Oceniane zmienne	Mediana (IQR), n (%)
N	608
K/M n (%)	319 (52) / 289 (48)
Wiek (lata)	34 (26-43)
Czas trwania cukrzycy (lata)	14 (9-22)
Palenie papierosów n (%)	137 (22)
Nadciśnienie tętnicze n (%)	208 (34)
ACE-I n (%)	243 (39)
Dawka insuliny (j/kg m.c./dobę)	0.46 (0.36-0.6)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24 (22-27)
Talia- kobiety (cm)	78 (73-86)
Talia- mężczyźni (cm)	90 (83-99)
WHR- kobiety	0.8 (0.7-0.8)
WHR- mężczyźni	0.9 (0.8-0.9)
VAI- kobiety	2.3 (1.5-3.3)
VAI- mężczyźni	2.1 (1.5-3.2)
TG/HDL (mg/dl)	1.4 (0.9-2.1)
eGDR (mg/kg/min)	8.8 (6.4-10.3)
RR <sub>sk</sub> (mmHg)	125 (120-130)
RR <sub>rozk</sub> (mmHg)	80 (70-80)
PP (mmHg)	50 (40-50)
HbA1c (%)	7.8 (7.0-8.9)
hsCRP (mg/l)	1.1 (0.5-2.8)
TCH (mmol/l)	4.9 (4.3-5.6)
TG (mmol/l)	1.0 (0.8-1.4)
LDL cholesterol (mmol/l)	2.8 (2.3-3.4)
HDL cholesterol (mmol/l)	1.6 (1.4-2.0)
eGFR (wg MDRD) (ml/min/m <sup>2</sup> )	90 (80-90)
AF	2.3 (1.9-2.7)

**Tabela 2.** Charakterystyka kliniczna grupy badanej w zależności od obecności powikłań. n (%).

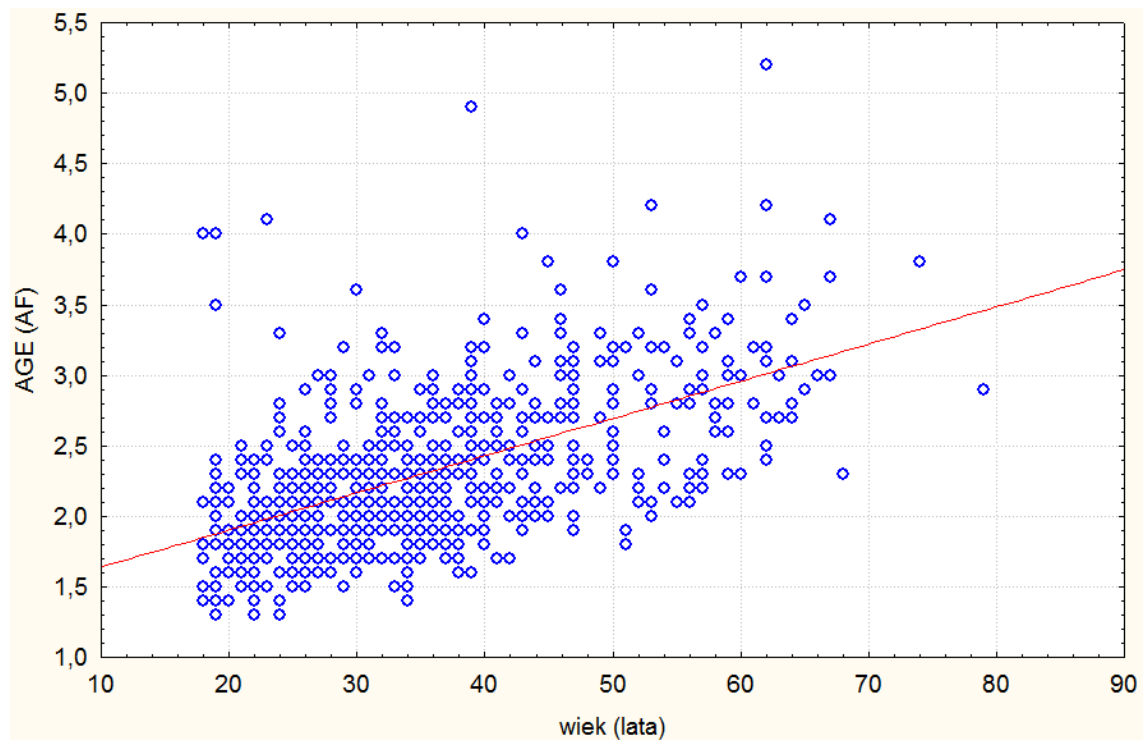
Oceniane zmienne	n (%)
Cukrzycowa choroba nerek, w tym:	106 (17)
stadium 1	37 (6)
stadium 2	40 (6.5)
stadium 3	27 (4.4)
stadium 4	2 (0.1)
Retinopatia, w tym:	270 (44)
Retinopatia nieproliferacyjna	169 (27)
Retinopatia proliferacyjna	101 (17)
Neuropatia n (%)	118 (19)
Jakakolwiek mikroangiopatia n (%)	296 (49)

#### **4. Zależności pomiędzy autofluorescencją skóry a wyrównaniem metabolicznym cukrzycy, wykładnikami insulinooporności i innymi czynnikami charakteryzującymi klinicznie grupę badaną**

W badanej grupie uzyskano dodatnią korelację pomiędzy wartością AF a wiekiem pacjentów ( $R_s=0.58$ ,  $p<0.001$ ), czasem trwania choroby ( $R_s=0.41$ ,  $p<0.001$ ), obwodem talii u kobiet ( $R_s=0.21$ ,  $p<0.001$ ), wartością wskaźnika WHR u kobiet ( $R_s=0.22$ ,  $p<0.001$ ) i mężczyzn ( $R_s=0.25$ ,  $p<0.001$ ), wartością ciśnienia tętniczego krwi skurczowego ( $R_s=0.17$ ,  $p<0.001$ ) i rozkurczowego ( $R_s=0.08$ ,  $p=0.04$ ), wartością ciśnienia tętna (PP) ( $R_s=0.13$ ,  $p=0.002$ ) oraz wartościami parametrów gospodarki lipidowej: stężeniem cholesterolu całkowitego (TCH) ( $R_s=0.17$ ,  $p<0.001$ ), stężeniem frakcji LDL cholesterolu ( $R_s=0.10$ ,  $p=0.01$ ), stężeniem frakcji HDL cholesterolu

( $R_s=0.09$ ,  $p=0.02$ ) oraz stężeniem trójglicerydów (TG) ( $R_s=0.16$ ,  $p<0.001$ ) w surowicy. Uzyskano ponadto ujemną korelację pomiędzy wartością AF a wartością oszacowanego wskaźnika filtracji kłębuszkowej (eGFR) ( $R_s=-0.27$ ,  $p<0.001$ ) oraz wartością oszacowanego wskaźnika dystrybucji glukozy (eGDR) ( $R_s=-0.28$ ,  $p<0.001$ ).

Wyniki przedstawiono na **rycynie 2** i w **tabeli 3**.



**Rycina 2.** Wykres zależności pomiędzy AF a wiekiem pacjentów.  $R_s=0.58$ ,  $p<0.001$ .

Test korelacji Spearmana.



**Tabela 3.** Zależność pomiędzy AF a wybranymi parametrami. Współczynnik korelacji Spearmana.

Oceniane zmienne	R <sub>s</sub>	p
<b>Wiek</b>	<b>0.58</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>Czas trwania cukrzycy (lata)</b>	<b>0.41</b>	<b>&lt;0.001</b>
Dawka insuliny (j/kg m.c./dobę)	-0.04	0.37
Masa ciała (kg)	-0.005	0.89
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0.07	0.10
<b>Talia-kobiety (cm)</b>	<b>0.21</b>	<b>&lt;0.001</b>
Talia- mężczyźni (cm)	0.11	0.07
<b>WHR- kobiety</b>	<b>0.22</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>WHR- mężczyźni</b>	<b>0.25</b>	<b>&lt;0.001</b>
VAI- kobiety	0.06	0.25
VAI- mężczyźni	0.11	0.07
<b>eGDR (mg/kg/min)</b>	<b>-0.28</b>	<b>&lt;0.001</b>
TG/HDL (mg/dl)	0.07	0.10
<b>RR<sub>sk</sub> (mmHg)</b>	<b>0.17</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>RR<sub>rozk</sub> (mmHg)</b>	<b>0.08</b>	<b>0.04</b>
<b>PP (mmHg)</b>	<b>0.13</b>	<b>0.002</b>
HbA1c (%)	0.07	0.08
<b>TCH (mmol/l)</b>	<b>0.17</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>TG (mmol/l)</b>	<b>0.16</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>LDL cholesterol (mmol/l)</b>	<b>0.10</b>	<b>0.01</b>
<b>HDL cholesterol (mmol/l)</b>	<b>0.09</b>	<b>0.02</b>
<b>eGFR (wg MDRD) (ml/min/m<sup>2</sup>)</b>	<b>-0.27</b>	<b>&lt;0.001</b>

## 5. Porównanie pacjentów z obecnością cukrzycowej choroby nerek (CChN) i bez CChN z uwzględnieniem AF skóry

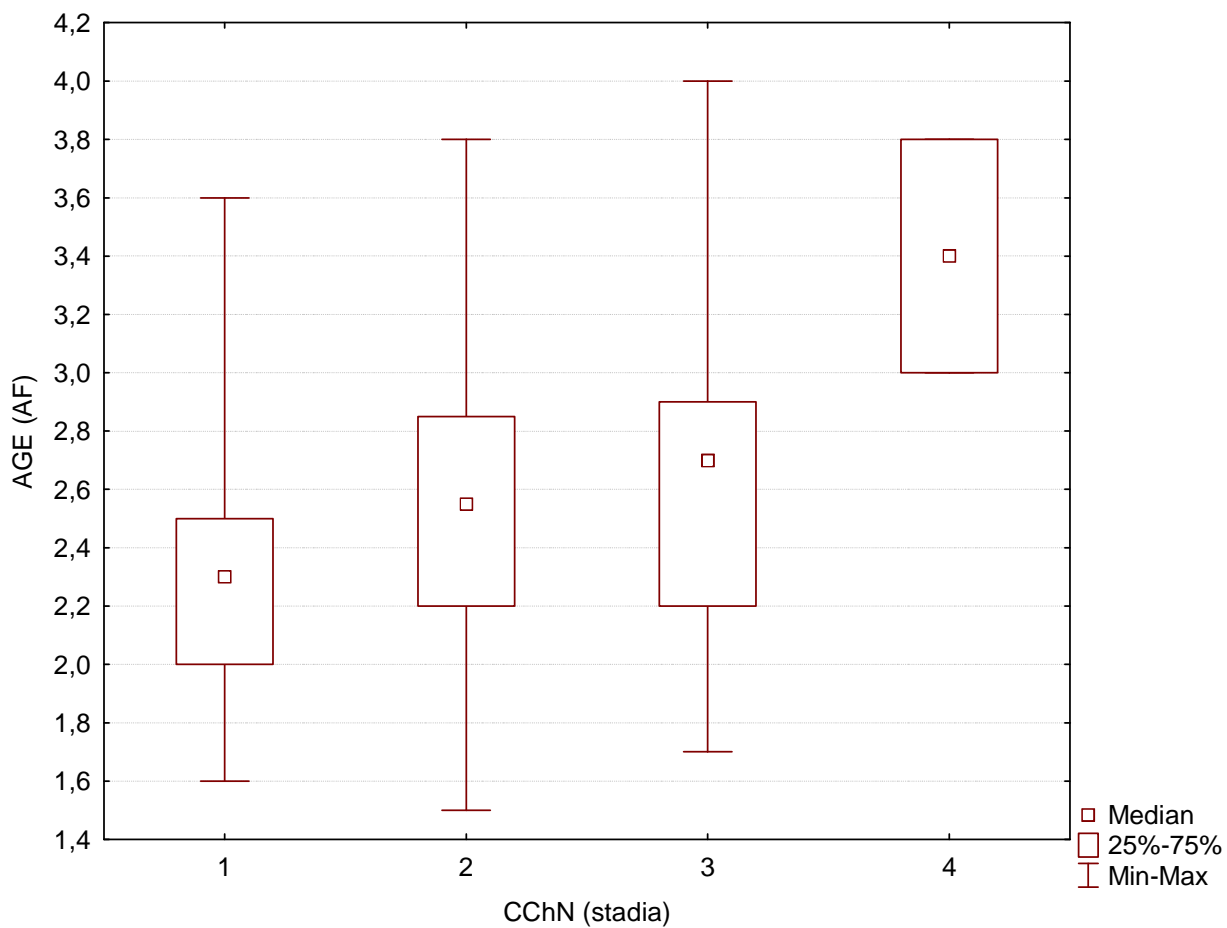
Osoby z cukrzycową chorobą nerek były starsze [38 (29-46) vs 32 (25-41) lat,  $p<0.001$ ], miały dłuższy czas trwania choroby [22 (16-29) vs 13 (8-20) lat,  $p<0.001$ ], istotnie częściej rozpoznawano u nich nadciśnienie tętnicze (60 vs 29%,  $p<0.001$ ) oraz częściej przyjmowały one preparaty inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACE-I) (92 vs 29%,  $p<0.001$ ) w porównaniu do pacjentów bez CChN. W grupie osób z CChN stwierdzono istotnie wyższe wartości wskaźnika VAI u mężczyzn [2.8 (1.7-4.6) vs 2.0 (1.4-3.0),  $p<0.001$ ], wyższe wartości stosunku TG/HDL w surowicy [1.6 (1.1-2.8) vs 1.4 (0.9-2.1) mg/dl,  $p<0.001$ ], niższe wartości oszacowanego wskaźnika dystrybucji glukozy (eGDR) [6.8 (5.0-9.4) vs 9.0 (6.9-10.4) mg/kg/min,  $p<0.001$ ] oraz wyższe wartości ciśnienia tętniczego krwi skurczowego [130 (120-140) vs 120 (120-130) mmHg,  $p<0.001$ ] i rozkurczowego [80 (80-85) vs 80 (70-80) mmHg,  $p<0.001$ ], a także wyższe wartości ciśnienia tętna (PP) [50 (40-50) vs 45 (40-50) mmHg,  $p=0.02$ ]. Ponadto osoby z CChN miały znamienne niższe wartości oszacowanego wskaźnika przesączania kłębuszkowego (eGFR) [78.8 (56.9-90.0) vs 90 (83.6-90.0) ml/min/m<sup>2</sup>,  $p<0.001$ ] oraz wyższe wartości HbA1c [8.1 (7.3-9.4) vs 7.7 (6.9-8.8) %,  $p=0.01$ ] w porównaniu z wartościami stwierdzanymi u osób bez CChN.

W grupie pacjentów z cukrzycową chorobą nerek stwierdzono istotnie wyższe wartości AF w porównaniu z osobami bez CChN [2.4 (2.1-2.8) vs 2.2 (1.9-2.6),  $p<0.001$ ]. Pacjenci z wyższymi stadiami CChN mieli istotnie wyższe wartości AF [stadium 4: 3.4 (3.0-3.8), stadium 3: 2.7 (2.2-2.9), stadium 2: 2.5 (2.2-2.8), stadium 1: 2.3 (2.0-2.5),  $p=0.02$ ].

Wyniki przedstawiono w **tabeli 4** i na **rycynie 3**.

**Tabela 4.** Charakterystyka kliniczna pacjentów z obecnością CChN oraz osób bez CChN. Test Manna-Whitney a. Mediana (IQR), n (%).

Oceniane zmienne	Cukrzycowa choroba nerek		p
	TAK N=106	NIE N=502	
K/M (n)	54/52	265/237	NS
<b>Wiek (lata)</b>	<b>38 (29-46)</b>	<b>32 (25-41)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
<b>Czas trwania cukrzycy (lata)</b>	<b>22 (16-29)</b>	<b>13 (8-20)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
Palenie papierosów n (%)	29 (27)	108 (21)	NS
<b>Nadciśnienie tętnicze n (%)</b>	<b>64 (60)</b>	<b>144 (29)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
<b>ACE-I n (%)</b>	<b>98 (92)</b>	<b>145 (29)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
Dawka insuliny (j/kg m.c./dobę)	0.42 (0.33-0.6)	0.47 (0.36-0.6)	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24 (21-28)	24 (22-27)	NS
Talia- kobiety (cm)	79 (74-89)	78 (72-86)	NS
Talia- mężczyźni (cm)	92 (86-99)	90 (83-99)	NS
WHR- kobiety	0.8 (0.7-0.8)	0.8 (0.7-0.8)	NS
WHR- mężczyźni	0.9 (0.8-0.9)	0.9 (0.8-0.9)	NS
VAI- kobiety	2.4 (1.8-4.0)	2.2 (1.5-3.2)	NS
<b>VAI- mężczyźni</b>	<b>2.8 (1.7-4.6)</b>	<b>2.0 (1.4-3.0)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
<b>TG/HDL (mg/dl)</b>	<b>1.6 (1.1-2.8)</b>	<b>1.4 (0.9-2.1)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
<b>eGDR (mg/kg/min)</b>	<b>6.8 (5.0-9.4)</b>	<b>9.0 (6.9-10.4)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
<b>RR<sub>sk</sub> (mmHg)</b>	<b>130 (120-140)</b>	<b>120 (120-130)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
<b>RR<sub>rozk</sub> (mmHg)</b>	<b>80 (80-85)</b>	<b>80 (70-80)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
<b>PP (mmHg)</b>	<b>50 (40-50)</b>	<b>45 (40-50)</b>	<b>0.02</b>
<b>HbA1c (%)</b>	<b>8.1 (7.3-9.4)</b>	<b>7.7 (6.9-8.8)</b>	<b>0.01</b>
hsCRP (mg/l)	1.1 (0.7-3.0)	1.1 (0.5-2.7)	NS
TCH (mmol/l)	5.0 (4.3-5.7)	4.9 (4.3-5.6)	NS
TG (mmol/l)	1.1 (0.8-1.4)	1.0 (0.8-1.4)	NS
LDL cholesterol (mmol/l)	2.8 (2.3-3.5)	2.8 (2.3-3.4)	NS
HDL cholesterol (mmol/l)	1.6 (1.3-2.0)	1.7 (1.4-2.0)	NS
<b>eGFR (wg MDRD) (ml/min/m<sup>2</sup>)</b>	<b>78.8 (56.9-90.0)</b>	<b>90.0 (83.6-90.0)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
<b>AF</b>	<b>2.4 (2.1-2.8)</b>	<b>2.2 (1.9-2.6)</b>	<b>p&lt;0.001</b>



**Rycina 3.** Wartości AF w zależności od stadium CChN. Test ANOVA rang Kruskala-Wallis.  $p=0.02$ .

## 6. Porównanie pacjentów z obecnością retinopatii cukrzycowej i bez retinopatii cukrzycowej z uwzględnieniem AF skóry

Osoby z retinopatią cukrzycową były starsze [39 (29-50) vs 30 (24-37) lat,  $p<0.001$ ], miały dłuższy czas trwania choroby [21 (15-28) vs 11 (7-15) lat,  $p<0.001$ ], istotnie częściej rozpoznawano u nich nadciśnienie tętnicze [52 vs 20%,  $p<0.001$ ] oraz częściej przyjmowały one preparaty ACE-I (63 vs 22%,  $p<0.001$ ) w porównaniu do pacjentów bez zmian na dnie oka. W grupie osób z retinopatią cukrzycową w porównaniu do osób bez retinopatii stwierdzono istotnie większy obwód talii u kobiet [80 (74-89) vs 77 (71-85) cm,  $p=0.007$ ] i u mężczyzn [92 (85-101) vs 90 (80-98) cm,  $p=0.01$ ], wyższe wartości wskaźnika WHR u kobiet [0.8 (0.8-0.9) vs 0.7 (0.7-0.8),  $p=0.007$ ] i u mężczyzn [0.9 (0.9-1.0) vs 0.8 (0.8-0.9),  $p<0.001$ ], a także wyższe wartości wskaźnika VAI u kobiet [2.5 (1.7-4.0) vs 2.1 (1.4-3.0),  $p=0.01$ ] i u mężczyzn [2.2 (1.5-3.9) vs 2.0 (1.4-3.0),  $p=0.01$ ]. Ponadto osoby z retinopatią cukrzycową miały znamienne wyższe wartości stosunku TG/HDL w surowicy [1.5 (1.0-2.4) vs 1.3 (0.9-1.9) mg/dl,  $p=0.002$ ], niższe wartości oszacowanego wskaźnika dystrybucji glukozy (eGDR) [7.3 (5.4-9.5) vs 9.4 (7.7-10.6) mg/kg/min,  $p<0.001$ ], wyższe wartości ciśnienia tętniczego krwi skurczowego [130 (120-140) vs 120 (120-130) mmHg,  $p=0.003$ ] oraz ciśnienia tętna (PP) [50 (40-50) vs 45 (40-50) mmHg,  $p=0.004$ ] w porównaniu do osób bez zmian na dnie oka. Pacjenci z retinopatią charakteryzowali się też niższą wartością oszacowanego wskaźnika przesączania kłębuszkowego (eGFR) [87.9 (74.2-90.0) vs 90.0 (85.5-90.0) ml/min/m<sup>2</sup>,  $p<0.001$ ] oraz wyższą wartością HbA1c [7.9 (7.2-9.0) vs 7.6 (6.8-8.9) %,  $p=0.02$ ].

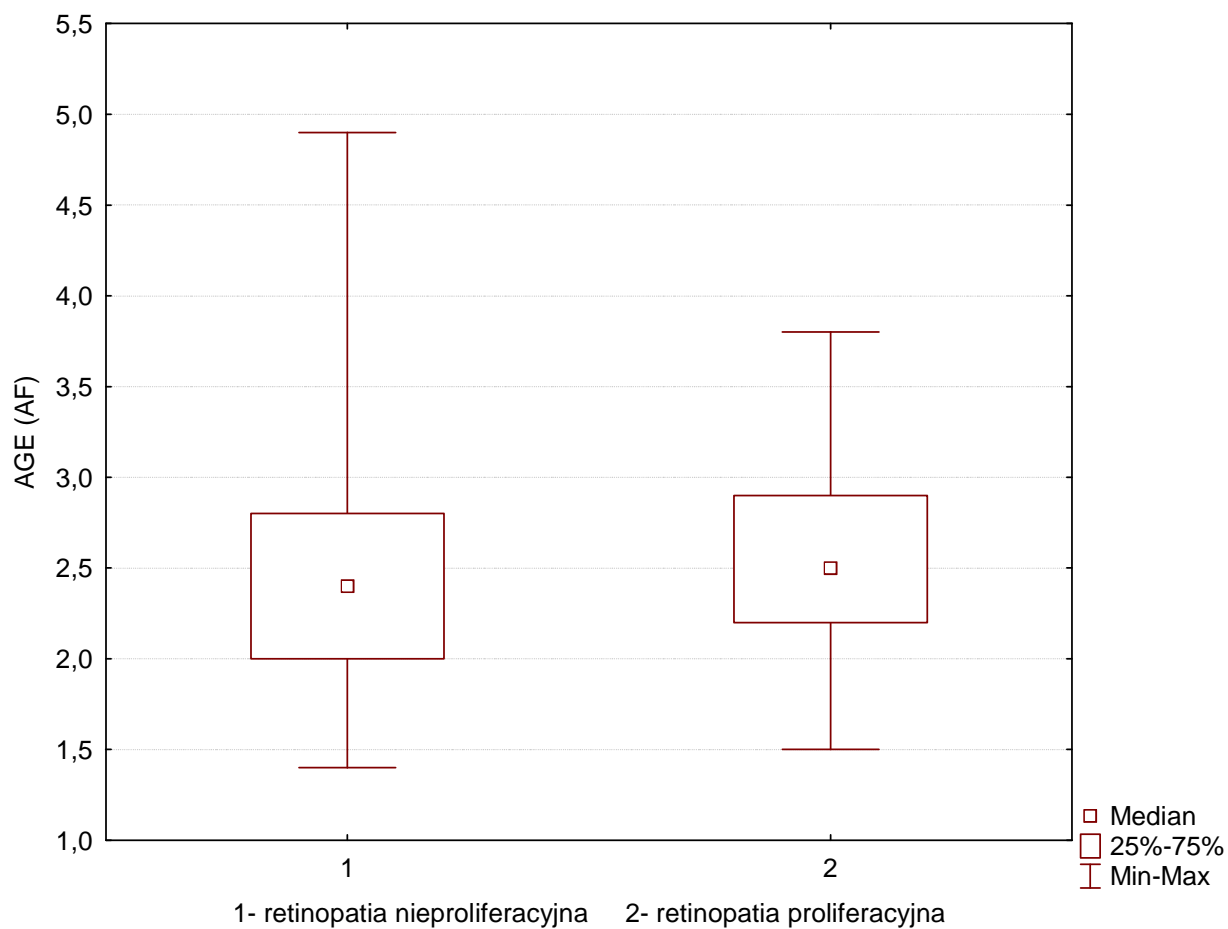
W grupie pacjentów z retinopatią stwierdzono istotnie wyższe wartości AF w porównaniu z osobami bez zmian na dnie oka [2.4 (2.1-2.9) vs 2.1(1.8-2.4),  $p<0.001$ ].

Wyniki przedstawiono w **tabeli 5**.

**Tabela 5.** Charakterystyka kliniczna pacjentów z obecnością retinopatii oraz osób, u których nie doszło do zmian na dnie oka. Test Manna-Whitney'a. Mediana (IQR), n(%).

Oceniane zmienne	Retinopatia		p
	TAK N=270	NIE N=338	
K/M (n)	132/138	151/187	NS
<b>Wiek (lata)</b>	<b>39 (29-50)</b>	<b>30 (24-37)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
<b>Czas trwania cukrzycy (lata)</b>	<b>21 (15-28)</b>	<b>11 (7-15)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
Palenie papierosów n (%)	60 (22)	77 (23)	NS
<b>Nadciśnienie tętnicze n (%)</b>	<b>141 (52)</b>	<b>67 (20)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
<b>ACE-I n (%)</b>	<b>170 (63)</b>	<b>73 (22)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
Dawka insuliny (j/kg m.c./dobę)	0.45 (0.36-0.6)	0.46 (0.36-0.59)	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25 (22-28)	24 (22-27)	NS
<b>Talia- kobiety (cm)</b>	<b>80 (74-89)</b>	<b>77 (71-85)</b>	<b>0.007</b>
<b>Talia- mężczyźni (cm)</b>	<b>92 (85-101)</b>	<b>90 (80-98)</b>	<b>0.01</b>
<b>WHR- kobiety</b>	<b>0.8 (0.8-0.9)</b>	<b>0.7 (0.7-0.8)</b>	<b>0.007</b>
<b>WHR- mężczyźni</b>	<b>0.9 (0.9-1.0)</b>	<b>0.8 (0.8-0.9)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
<b>VAI- kobiety</b>	<b>2.5 (1.7-4.0)</b>	<b>2.1 (1.4-3.0)</b>	<b>0.01</b>
<b>VAI- mężczyźni</b>	<b>2.2 (1.5-3.9)</b>	<b>2.0 (1.4-3.0)</b>	<b>0.01</b>
<b>TG/HDL (mg/dl)</b>	<b>1.5 (1.0-2.4)</b>	<b>1.3 (0.9-1.9)</b>	<b>0.002</b>
<b>eGDR (mg/kg/min)</b>	<b>7.3 (5.4-9.5)</b>	<b>9.4 (7.7-10.6)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
<b>RR<sub>sk</sub> (mmHg)</b>	<b>130 (120-140)</b>	<b>120 (120-130)</b>	<b>0.003</b>
RR <sub>rozk</sub> (mmHg)	80 (70-80)	80 (70-80)	NS
<b>PP (mmHg)</b>	<b>50 (40-50)</b>	<b>45 (40-50)</b>	<b>0.004</b>
<b>HbA1c (%)</b>	<b>7.9 (7.2-9.0)</b>	<b>7.6 (6.8-8.9)</b>	<b>0.02</b>
hsCRP (mg/l)	1.1 (0.5-2.9)	1.2 (0.6-2.6)	NS
TCH (mmol/l)	4.9 (4.4-5.7)	4.9 (4.2-5.5)	NS
TG (mmol/l)	1.0 (0.8-1.4)	1.0 (0.8-1.5)	NS
LDL cholesterol (mmol/l)	2.8 (2.3-3.4)	2.8 (2.3-3.4)	NS
HDL cholesterol (mmol/l)	1.6 (1.4-2.0)	1.7 (1.4-2.0)	NS
<b>eGFR (wg MDRD) (ml/min/m<sup>2</sup>)</b>	<b>87.9 (74.2-90.0)</b>	<b>90.0 (85.5-90.0)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
<b>AF</b>	<b>2.4 (2.1-2.9)</b>	<b>2.1 (1.8-2.4)</b>	<b>p&lt;0.001</b>

Dodatkowo wartość AF była statystycznie wyższa u osób z retinopatią proliferacyjną w porównaniu do pacjentów z retinopatią nieproliferacyjną [2.5 (2.2-2.9) vs 2.4 (2.0-2.8),  $p=0.02$ ] (**rycina 4**).



**Rycina 4.** Wskaźnik autofluorescencji skóry u osób z retinopatią proliferacyjną i z retinopatią nieproliferacyjną.

## 7. Porównanie pacjentów z obecnością neuropatii cukrzycowej i bez neuropatii cukrzycowej z uwzględnieniem AF skóry

Osoby z neuropatią cukrzycową były starsze [44 (34-55) vs 31 (25-39) lat,  $p<0.001$ ], miały dłuższy czas trwania choroby [23 (18-31) vs 13 (8-19) lat,  $p<0.001$ ], istotnie częściej rozpoznawano u nich nadciśnienie tętnicze [68 vs 26%,  $p<0.001$ ] oraz częściej przyjmowały one preparaty ACE-I (80 vs 30%,  $p<0.001$ ) w porównaniu do osób bez neuropatii. W grupie mężczyzn z neuropatią stwierdzono istotnie większy obwód talii [94 (87-103) vs 90 (82-98) cm,  $p=0.008$ ], wyższe wartości wskaźnika WHR [0.9 (0.8-1.0) vs 0.8 (0.8-0.9),  $p=0.008$ ] oraz wyższe wartości wskaźnika VAI [2.4 (1.6-4.4) vs 2.0 (1.4-3.1),  $p=0.02$ ] w porównaniu do wartości uzyskanych u mężczyzn bez wykładników uszkodzenia obwodowego układu nerwowego. Osoby z neuropatią cukrzycową miały znamienne wyższe wartości stosunku TG/HDL w surowicy [1.6 (1.1-2.4) vs 1.4 (0.9-2.1) mg/dl,  $p=0.03$ ], niższe wartości oszacowanego wskaźnika dystrybucji glukozy (eGDR) [6.0 (4.9-7.9) vs 9.1 (7.2-10.4) mg/kg/min,  $p<0.001$ ] oraz niższe wartości oszacowanego wskaźnika przesączania kłębuszkowego (eGFR) [84.3 (70.1-90.0) vs 90.0 (83.0-90.0) ml/min/m<sup>2</sup>,  $p<0.001$ ] w porównaniu do osób bez neuropatii. Ponadto u pacjentów z neuropatią cukrzycową w porównaniu do osób bez wykładników uszkodzenia obwodowego układu nerwowego stwierdzono istotnie wyższe wartości ciśnienia tętniczego krwi skurczowego [130 (120-140) vs 120 (120-130) mmHg,  $p=0.006$ ] i rozkurczowego [80 (70-90) vs 80 (70-80) mmHg,  $p=0.01$ ], wyższe wartości HbA1c [8.1 (7.3-9.3) vs 7.7 (6.9-8.8) %,  $p=0.001$ ] oraz wyższe stężenia cholesterolu całkowitego w surowicy [5.0 (4.5-5.8) vs 4.9 (4.2-5.6) mmol/l,  $p=0.04$ ]. W grupie pacjentów z neuropatią stwierdzono istotnie wyższe wartości AF w porównaniu z osobami bez neuropatii [2.7 (2.3-3.0) vs 2.1 (1.9-2.5),  $p<0.001$ ]. Wyniki przedstawiono w **tabeli 6**.



**Tabela 6.** Charakterystyka kliniczna pacjentów z obecnością neuropatii oraz osób bez wykładników uszkodzenia obwodowego układu nerwowego. Test Manna-Whitney'a. Mediana (IQR), n (%).

Oceniane zmienne	Neuropatia		p
	TAK N=118	NIE N=489	
K/M (n)	58/60	261/228	NS
<b>Wiek (lata)</b>	<b>44 (34-55)</b>	<b>31 (25-39)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
<b>Czas trwania cukrzycy (lata)</b>	<b>23 (18-31)</b>	<b>13 (8-19)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
Palenie papierosów n (%)	27 (23)	109 (22)	NS
<b>Nadciśnienie tętnicze n (%)</b>	<b>80 (68)</b>	<b>128 (26)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
<b>ACE-I n (%)</b>	<b>94 (80)</b>	<b>149 (30)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
Dawka insuliny (j/kg m.c./dobę)	0.48 (0.37-0.6)	0.46 (0.36-0.58)	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24 (22-29)	24 (22-27)	NS
Talia- kobiety (cm)	78 (74-90)	78 (72-86)	NS
<b>Talia- mężczyźni (cm)</b>	<b>94 (87-103)</b>	<b>90 (82-98)</b>	<b>0.008</b>
WHR- kobiety	0.8 (0.8-0.9)	0.8 (0.7-0.8)	NS
<b>WHR- mężczyźni</b>	<b>0.9 (0.8-1.0)</b>	<b>0.8 (0.8-0.9)</b>	<b>0.008</b>
VAI- kobiety	2.4 (1.6-4.0)	2.3 (1.5-3.1)	NS
<b>VAI- mężczyźni</b>	<b>2.4 (1.6-4.4)</b>	<b>2.0 (1.4-3.1)</b>	<b>0.02</b>
<b>TG/HDL (mg/dl)</b>	<b>1.6 (1.1-2.4)</b>	<b>1.4 (0.9-2.1)</b>	<b>0.03</b>
<b>eGDR (mg/kg/min)</b>	<b>6.0 (4.9-7.9)</b>	<b>9.1 (7.2-10.4)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
<b>RR<sub>sk</sub> (mmHg)</b>	<b>130 (120-140)</b>	<b>120 (120-130)</b>	<b>0.006</b>
<b>RR<sub>rozk</sub> (mmHg)</b>	<b>80 (70-90)</b>	<b>80 (70-80)</b>	<b>0.01</b>
PP (mmHg)	50 (40-55)	50 (40-50)	NS
<b>HbA1c (%)</b>	<b>8.1 (7.3-9.3)</b>	<b>7.7 (6.9-8.8)</b>	<b>0.001</b>
hsCRP (mg/l)	1.1 (0.6-2.9)	1.1 (0.5-2.6)	NS
<b>TCH (mmol/l)</b>	<b>5.0 (4.5-5.8)</b>	<b>4.9 (4.2-5.6)</b>	<b>0.04</b>
TG (mmol/l)	1.1 (0.8-1.4)	1.0 (0.8-1.4)	NS
LDL cholesterol (mmol/l)	2.8 (2.3-3.4)	2.8 (2.3-3.4)	NS
HDL cholesterol (mmol/l)	1.6 (1.4-2.1)	1.6 (1.4-1.96)	NS
<b>eGFR (wg MDRD) (ml/min/m<sup>2</sup>)</b>	<b>84.3 (70.1-90.0)</b>	<b>90.0 (83.0-90.0)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
<b>AF</b>	<b>2.7 (2.3-3.0)</b>	<b>2.1 (1.9-2.5)</b>	<b>p&lt;0.001</b>

## 8. Porównanie pacjentów z obecnością jakiegokolwiek mikroangiopatii cukrzycowej i bez mikroangiopatii cukrzycowej z uwzględnieniem AF skóry

Osoby z mikroangiopatią cukrzycową były starsze [39 (29-50) vs 30 (23-37) lat,  $p<0.001$ ], miały dłuższy czas trwania choroby [21 (15-28) vs 10 (7-14) lat,  $p<0.001$ ], istotnie częściej rozpoznawano u nich nadciśnienie tętnicze [52 vs 18%,  $p<0.001$ ] oraz częściej przyjmowały one preparaty ACE-I (63 vs 18%,  $p<0.001$ ) w porównaniu do osób bez mikroangiopatii. W grupie osób z mikroangiopatią stwierdzono istotnie wyższe wartości wskaźnika masy ciała (BMI) [25 (22-28) vs 24 (22-27)  $\text{kg/m}^2$ ,  $p=0.03$ ], większy obwód talii u kobiet [80 (74-89) vs 77 (71-85) cm,  $p=0.008$ ] i u mężczyzn [92 (85-101) vs 89 (80-97) cm,  $p=0.005$ ], wyższe wartości wskaźnika WHR u kobiet [0.8 (0.8-0.9) vs 0.7 (0.7-0.8),  $p=0.01$ ] i u mężczyzn [0.9 (0.8-1.0) vs 0.8 (0.8-0.9),  $p<0.001$ ], wyższe wartości wskaźnika VAI u kobiet [2.5 (1.6-4.0) vs 2.1 (1.5-3.0),  $p=0.01$ ] i u mężczyzn [2.2 (1.5-3.8) vs 2.0 (1.4-3.0),  $p=0.03$ ] w porównaniu z wartościami stwierdzanymi u osób bez mikroangiopatii. Ponadto osoby z mikroangiopatią cukrzycową miały znamienne wyższe wartości stosunku TG/HDL w surowicy [1.5 (1.0-2.4) vs 1.3 (0.9-1.9) mg/dl,  $p=0.004$ ], niższe wartości eGDR [7.4 (5.5-9.7) vs 9.5 (7.9-10.7) mg/kg/min,  $p<0.001$ ] oraz niższe wartości eGFR [87.9 (74.5-90.0) vs 90.0 (86.1-90.0) ml/min/ $\text{m}^2$ ,  $p<0.001$ ] w porównaniu z wartościami stwierdzanymi u osób bez mikroangiopatii. Pacjenci z mikroangiopatią w porównaniu do osób bez powikłań mieli wyższe wartości ciśnienia tętniczego krwi skurczowego [130 (120-135) vs 120 (118.5-130) mmHg,  $p=0.002$ ], ciśnienia tętna (PP) [50 (40-50) vs 45 (40-50) mmHg,  $p=0.003$ ] oraz wyższe wartości HbA1c [7.9 (7.2-9.0) vs 7.5 (6.8-8.9)%,  $p=0.01$ ]. W grupie pacjentów z mikroangiopatią stwierdzono istotnie wyższe wartości AF w porównaniu z osobami bez mikroangiopatii [2.4 (2.1-2.8) vs 2.1(1.8-2.3),  $p<0.001$ ]. Wyniki przedstawiono w **tabeli 7**.

**Tabela 7.** Charakterystyka kliniczna pacjentów z obecnością jakiegokolwiek mikroangiopatii oraz osób, u których nie doszło do rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy. Test Manna-Whitney a. Mediana (IQR), n (%).

Oceniane zmienne	Mikroangiopatia		p
	TAK N=296	NIE N=312	
K/M (n)	147/149	172/149	NS
Wiek (lata)	<b>39 (29-50)</b>	<b>30 (23-37)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
Czas trwania cukrzycy (lata)	<b>21 (15-28)</b>	<b>10 (7-14)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
Palenie papierosów n (%)	65 (22)	72 (23)	NS
Nadciśnienie tętnicze n (%)	<b>153 (52)</b>	<b>55 (18)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
ACE-I n (%)	<b>187 (63)</b>	<b>56 (18)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
Dawka insuliny (j/kg m.c./dobę)	0.46 (0.36-0.6)	0.46 (0.36-0.58)	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	<b>25 (22-28)</b>	<b>24 (22-27)</b>	<b>0.03</b>
Talia- kobiety (cm)	<b>80 (74-89)</b>	<b>77 (71-85)</b>	<b>0.008</b>
Talia- mężczyźni (cm)	<b>92 (85-101)</b>	<b>89 (80-97)</b>	<b>0.005</b>
WHR- kobiety	<b>0.8 (0.8-0.9)</b>	<b>0.7 (0.7-0.8)</b>	<b>0.01</b>
WHR- mężczyźni	<b>0.9 (0.8-1.0)</b>	<b>0.8 (0.8-0.9)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
VAI- kobiety	<b>2.5 (1.6-4.0)</b>	<b>2.1 (1.5-3.0)</b>	<b>0.01</b>
VAI- mężczyźni	<b>2.2 (1.5-3.8)</b>	<b>2.0 (1.4-3.0)</b>	<b>0.03</b>
TG/HDL (mg/dl)	<b>1.5 (1.0-2.4)</b>	<b>1.3 (0.9-1.9)</b>	<b>0.004</b>
eGDR (mg/kg/min)	<b>7.4 (5.5-9.7)</b>	<b>9.5 (7.9-10.7)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
RR <sub>sk</sub> (mmHg)	<b>130 (120-135)</b>	<b>120 (118.5-130)</b>	<b>0.002</b>
RR <sub>rozk</sub> (mmHg)	80 (70-80)	80 (70-80)	NS
PP (mmHg)	<b>50 (40-50)</b>	<b>45 (40-50)</b>	<b>0.003</b>
HbA1c (%)	<b>7.9 (7.2-9.0)</b>	<b>7.5 (6.8-8.9)</b>	<b>0.01</b>
hsCRP (mg/l)	1.1 (0.5-2.9)	1.2 (0.6-2.7)	NS
TCH (mmol/l)	4.9 (4.4-5.7)	4.9 (4.2-5.5)	NS
TG (mmol/l)	1.0 (0.8-1.4)	1.0 (0.7-1.5)	NS
LDL cholesterol (mmol/l)	2.8 (2.3-3.4)	2.8 (2.3-3.4)	NS
HDL cholesterol (mmol/l)	1.6 (1.4-2.0)	1.7 (1.4-1.96)	NS
eGFR (wg MDRD) (ml/min/m <sup>2</sup> )	<b>87.9 (74.5-90.0)</b>	<b>90.0 (86.1-90.0)</b>	<b>p&lt;0.001</b>
AF	<b>2.4 (2.1-2.8)</b>	<b>2.1 (1.8-2.3)</b>	<b>p&lt;0.001</b>

## **9. Związek pomiędzy wynikami autofluorescencji skóry a obecnością mikroangiopatii cukrzycowej**

W modelu regresji jednoczynnikowej wykazano istotny związek wartości AF skóry z obecnością retinopatii cukrzycowej [OR 3.0 (95%CI: 2.2-4.2),  $p < 0.001$ ], cukrzycowej choroby nerek [OR 2.0 (95%CI: 1.4-2.8),  $p < 0.001$ ], neuropatii cukrzycowej [OR 4.3 (95%CI: 2.9-6.3),  $p < 0.001$ ] oraz jakiegokolwiek mikroangiopatii cukrzycowej [OR 3.6 (95%CI: 2.6-5.1),  $p < 0.001$ ].

W modelu regresji wieloczynnikowej obecność retinopatii cukrzycowej była niezależnie związana z płcią męską [OR 1.72 (95%CI: 1.11-2.64),  $p = 0.01$ ], czasem trwania choroby [OR 1.17 (95%CI: 1.13-1.21),  $p < 0.001$ ], obecnością nadciśnienia tętniczego [OR 2.86 (95% CI: 1.77-4.62),  $p < 0.001$ ] i wartością HbA1c [OR 1.34 (95%CI: 1.17-1.55),  $p < 0.001$ ]. Obecność cukrzycowej choroby nerek była niezależnie związana z czasem trwania choroby [OR 1.13 (95%CI: 1.09-1.17),  $p < 0.001$ ], obecnością nadciśnienia tętniczego [OR 4.27 (95%CI: 2.43-7.50),  $p < 0.001$ ] i wartością HbA1c [OR 1.26 (95%CI: 1.07-1.49),  $p = 0.005$ ]. Obecność jakiegokolwiek mikroangiopatii była niezależnie związana z płcią męską [OR 1.63 (95%CI: 1.05-2.55),  $p = 0.03$ ], czasem trwania choroby [OR 1.19 (95%CI: 1.15-1.23),  $p < 0.001$ ], obecnością nadciśnienia tętniczego [OR 3.07 (95%CI: 1.86-5.05),  $p < 0.001$ ] i wartością HbA1c [OR 1.38 (95%CI: 1.20-1.59),  $p < 0.001$ ]. Natomiast obecność neuropatii cukrzycowej była niezależnie związana z czasem trwania choroby [OR 1.08 (95%CI: 1.04-1.11),  $p < 0.001$ ], obecnością nadciśnienia tętniczego [OR 3.9 (95%CI: 2.2-6.8),  $p < 0.001$ ], wartością HbA1c [OR 1.48 (95%CI: 1.25-1.77),  $p < 0.001$ ] oraz wartością AF skóry [OR 1.94 (95%CI: 1.18-3.20),  $p < 0.001$ ].

Wyniki modelu regresji logistycznej wieloczynnikowej przedstawiono w **tabeli 8**.

**Tabela 8.** Model regresji logistycznej wieloczynnikowej dla mikroangiopatii cukrzycowej z uwzględnieniem zależności od płci męskiej, czasu trwania cukrzycy, palenia papierosów, nadciśnienia tętniczego, BMI, HbA1c, AF. OR (95% CI).

	Retinopatia		Cukrzycowa choroba nerek		Neuropatia		Jakakolwiek mikroangiopatia	
	p	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)
Płeć męska	<b>0.01</b>	<b>1.72 (1.11-2.64)</b>	NS	1.0 (0.59-1.68)	NS	1.16 (0.69-1.93)	<b>0.03</b>	<b>1.63 (1.05-2.55)</b>
Czas trwania cukrzycy	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.17 (1.13-1.21)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.13 (1.09-1.17)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.08 (1.04-1.11)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.19 (1.15-1.23)</b>
Palenie papierosów	NS	1.02 (0.62-1.67)	NS	1.73 (0.97-3.07)	NS	1.09 (0.60-1.98)	NS	0.97 (0.59-1.62)
Nadciśnienie tętnicze	<b>&lt;0.001</b>	<b>2.86 (1.77-4.62)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>4.27 (2.43-7.50)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>3.9 (2.2-6.8)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>3.07 (1.86-5.05)</b>
BMI	NS	0.95 (0.90-1.00)	NS	0.95 (0.89-1.01)	NS	0.96 (0.90-1.02)	NS	0.96 (0.91-1.01)
HbA1c	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.34 (1.17-1.55)</b>	<b>0.005</b>	<b>1.26 (1.07-1.49)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.48 (1.25-1.77)</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.38 (1.20-1.59)</b>
AF	NS	1.26 (0.81-1.97)	NS	1.35 (0.82-2.22)	<b>&lt;0.001</b>	<b>1.94 (1.18-3.20)</b>	NS	1.46 (0.91-2.31)

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

Nie budzi już dzisiaj wątpliwości fakt, iż zasadniczym problemem w terapii cukrzycy jest rozwój przewlekłych powikłań choroby, prowadzących do ciężkiego kalectwa lub przedwczesnej śmierci. Pomimo ogromnego postępu, jaki dokonał się w tej dziedzinie od zastosowania po raz pierwszy insulinoterapii, nadal śmiertelność z powodu powikłań cukrzycy typu 1 jest zdecydowanie większa niż w odpowiedniej wiekowo grupie kontrolnej [81]. Zrozumiałe więc były ciągnące się przez całe lata nieustające dyskusje nad możliwościami poprawy losu tej grupy chorych [82]. Sugerowano już wówczas, że rozwój przewlekłych powikłań schorzenia opóźnić może utrzymywanie poziomów glukozy we krwi w pobliżu granic fizjologicznych. Większość lekarzy praktyków nie podzielała jednak tego poglądu. Zalecali oni utrzymywanie stanu umiarkowanej hiperglikemii, która z jednej strony niwelowała objawy kliniczne, z drugiej natomiast zmniejszała ryzyko wystąpienia hipoglikemii [83]. Na początku lat 90-tych Rosenstock i Raskin dopatrywali się znaczącego udziału, innych niż metaboliczne, czynników w patogenezie powikłań naczyniowych [84]. U około 25% chorych z typem 1 cukrzycy, obserwowali oni bowiem brak zależności pomiędzy występowaniem cukrzycowej mikroangiopatii a stanem wyrównania metabolicznego. Dopiero badanie DCCT i jego kontynuacja w postaci obserwacyjnego badania EDIC (Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications), jednoznacznie wskazały na dominującą rolę hiperglikemii w rozwoju i progresji powikłań cukrzycy typu 1 [13,85].

Ponieważ miernie podwyższone stężenia glukozy we krwi nie wywołują żadnych objawów klinicznych, dlatego też dla oceny przebiegu choroby konieczne jest stałe monitorowanie jej wyrównania metabolicznego. Postęp techniczny umożliwiający prowadzenie systematycznej samokontroli glikemii ułatwił wgląd w codzienne

zachowanie się stężenia glukozy we krwi. W celu wykazania zagrożenia rozwoju i progresji powikłań cukrzycy potrzebny był jednak jeszcze dodatkowy, względnie stabilny wskaźnik umożliwiający ocenę stanu wyrównania gospodarki węglowodanowej w dłuższym wymiarze czasowym. W typie 1 choroby rolę taką, od czasu badania DCCT, pełni glikowana hemoglobina HbA1c [13]. W ostatnich latach coraz częściej pojawiają się jednak wątpliwości dotyczące jej przydatności dla długoterminowego monitorowania stanu wyrównania metabolicznego cukrzycy, a tym samym dla zapobiegania rozwojowi przewlekłych powikłań choroby. Z badań epidemiologicznych i doświadczeń klinicznych wiadomo bowiem, że poza hiperglikemią inne jeszcze czynniki mogą przyspieszać ich rozwój i progresję, których nie uwidacznia bieżąca wartość HbA1c. Nie odzwierciedla ona bowiem np. dużych dobowych wahań glikemii. Z badań Quagliaro i wsp. wynika, że czynność komórek śródbłonna, wstępnego etapu rozwoju zmian naczyniowych, ulega głębokim zaburzeniom przede wszystkim pod wpływem dużych dobowych wahań stężeń glukozy we krwi [86]. Podobne wnioski wypływały z badań El-Osta i wsp. [87]. Przewlekła, stabilna hiperglikemia, podwyższająca wartość glikowanej hemoglobiny wydaje się natomiast odgrywać w tym zakresie zdecydowanie mniejszą rolę. Uważa się bowiem, że w jej obecności uruchamiane zostają mechanizmy adaptacyjne, których nie są w stanie wyzwolić nagłe, duże wahania stężeń glukozy we krwi. Pojawiły się ostatnio doniesienia, że podwyższona wartość HbA1c ma znaczenie prognostyczne dopiero wówczas, gdy bierze się pod uwagę średnią wyliczoną z jej oznaczeń dokonywanych w ciągu wielu lat [88]. Dlatego też, w ostatnich latach coraz częściej podejmuje się próby wykorzystania dla celów monitorowania cukrzycy innych niż HbA1c biomarkerów [89,90].

Znaczenie prognostyczne w rozwoju mikrangiopatii cukrzycowej przypisuje się ostatnio oznaczeniom dwuwęglowych produktów glikacji [91,92]. Wydaje się jednak, że najbardziej obiecujące dla tych celów są możliwości wykorzystania stabilnych, długożyjących produktów nasilonej glikacji białek, zwłaszcza że dostępna jest aktualnie prosta metoda ich oznaczania za pomocą autofluorescencji skóry. Okres półtrwania AGEs jest wielokrotnie dłuższy aniżeli glikowanej hemoglobiny, a także reaktywnych dwuwęglowych pochodnych glikacji. Stanowią one ponadto wykładnik gromadzonych w skórze produktów nie tylko glikacji, lecz także glikooksydacji i lipooksydacji, co określa się mianem „*carbonyl stress*”. Sugerowano, że ten biomarker może z powodzeniem zastąpić HbA1c, a nawet średnią jej wartość z wieloletnich oznaczeń. Badanie Monnier i wsp. ujawniło bowiem już wcześniej istnienie ścisłej korelacji pomiędzy zawartością AGEs w skórze a stopniem zaawansowania przewlekłych powikłań cukrzycy, zdecydowanie wyraźniejszą aniżeli z HbA1c [93]. Z kolei Yu i wsp., oceniając 54 pacjentów z typem 1 cukrzycy wyselekcjonowanych z badania DCCT, zwrócili uwagę, że u osób „preferowanych” do rozwoju powikłań, w stosunku do pacjentów „opornych”, stopień gromadzenia w skórze produktów glikacji i glikooksydacji był zdecydowanie bardziej nasilony w pierwszej grupie [94]. W ostatnio opublikowanych badaniach Genevieve i wsp. po raz kolejny zaobserwowano, że gromadzenie się AGEs w skórze odzwierciedla długotrwałą kontrolę glikemii, a nie stopień jej 3-miesięcznego wyrównania [95]. We wcześniejszych badaniach własnych wykazano, że wskaźnik autofluorescencji skóry był wyższy u osób z typem 1 cukrzycy niż u osób zdrowych [96]. Aktualnie najwyższe jego wartości notowano w obecności zaawansowanych powikłań mikronaczyniowych. W analizie wieloczynnikowej stwierdzano jednak związek zarówno aktualnej wartości glikowanej hemoglobiny jak i autofluorescencji skóry z obecnością powikłań. Należy jednak podkreślić, że oceniana



w badaniach własnych grupa chorych była stosunkowo dobrze wyrównana. Średnia u nich wartość HbA1c 7.8% była bowiem wyraźnie niższa niż w innych publikacjach obejmujących podobną liczbę pacjentów [97-99]. Za zadawalającym u nich i bezpiecznym wyrównaniem glikemii przemawiać mogą również obserwowane w badaniach własnych niskie wyniki stężenia białka C reaktywnego. Oceniane wysoko czułą metodą nie wskazywały na toczący się aktualnie przewlekły proces zapalny.

O związku podwyższonych wartości AGEs, mierzonych za pomocą autofluorescencji skóry, z rozwojem powikłań cukrzycy donosili już uprzednio liczni autorzy. Również we wcześniejszych badaniach zespołu kliniki wykazano istnienie ścisłej zależności pomiędzy wartością AF skóry, średnią wartością HbA1c w przebiegu choroby i obecnością powikłań mikronaczyniowych u osób z typem 1 cukrzycy [100]. Conway i wsp. stwierdzili natomiast istnienie ścisłego związku autofluorescencji skóry z obwodową i autonomiczną neuropatią [101]. Pojawiło się też wiele badań sugerujących uznawanie zawartości AGEs w skórze, jako czynnika ryzyka rozwoju miażdżycy. W badaniach własnych przeprowadzonych na grupie ponad 600 osób z typem 1 cukrzycy, z okresem trwania choroby powyżej 5 lat, potwierdzono zdecydowanie wyższe wartości AF skóry u osób z powikłaniami naczyniowymi, a zwłaszcza z neuropatią. Również znamienne wyższe wartości tego parametru notowano u osób z retinopatią proliferacyjną, aniżeli u chorych z obecnością jej wcześniejszych etapów rozwoju. W cukrzycowej chorobie nerek, zwiększone tworzenie produktów glikacji nasilone jest dodatkowo przez ich akumulację we krwi. W badaniach własnych wyższe wartości AF uzyskano u pacjentów z bardziej zaawansowanymi stadiami nefropatii cukrzycowej. Uzyskane wyniki, mogą więc potwierdzać wpływ glikacji białek na rozwój powikłań u osób z cukrzycą, pomimo aktualnego jej dobrego stanu wyrównania („pamięć hiperglikemii”).

Wskaźnik autofluorescencji był także ściśle związany z wiekiem osób badanych, z czasem trwania cukrzycy i wykładnikami insulinooporności. Czas trwania choroby z kolei wpływał na rozwój powikłań, nawet analizując oddzielnie każde z ocenianych powikłań. Podobne wyniki w grupie chorych z typem 1 cukrzycy uzyskali ostatnio Cleary i wsp.[102]. Shah S i wsp. wykazali natomiast, że zawartość AGEs w skórze dzieci z cukrzycą trwającą 4 - 6 lat, odpowiada ich gromadzeniu u osób zdrowych starszych o ok. 20 lat [103]. Potwierdza to wcześniejsze sugestie Cerami i wsp. z lat 80-tych XX w., że zjawisko nasilonej glikacji wiąże się nierozłącznie z procesem starzenia się komórek i tkanek [104]. Nazwali oni wówczas wpływ cukrzycy na stan ustroju jako „przyspieszony proces starzenia”. Od lat wiadomo także, że czas trwania cukrzycy wpływa nie tylko na rozwój mikroangiopatii i zmian miażdżycowych, lecz przede wszystkim na sztywność naczyń [105]. Januszewski i wsp. zwrócili uwagę na istnienie ujemnej korelacji pomiędzy autofluorescencją skóry a elastycznością małych tętnic [106]. Jest to zrozumiałe, ponieważ w skład ściany naczyń mikrokrążenia wchodzi białka pozakomórkowego matrix. Najistotniejszą wśród nich rolę odgrywa kolagen typu 1, stanowiący nie tylko podporę dla struktur skóry, lecz również uczestniczący w międzykomórkowej interakcji i wpływający na migrację, różnicowanie i proliferację znajdujących się w niej komórek. W warunkach hiperglikemii dochodzi do nasilonej glikacji białek pozakomórkowego matrix. Zjawisko to zaobserwowano zarówno w warunkach badań eksperymentalnych, jak i *in vivo* u ludzi z cukrzycą [107,108]. Związek sztywności naczyń z rozwojem powikłań, sugerować może uzyskany w badaniach własnych związek pomiędzy wartością ciśnienia tętna a autofluorescencją skóry.

W badaniach własnych, w modelu regresji wieloczynnikowej, dominujący wpływ na rozwój mikroangiopatii odgrywała, obok czasu trwania cukrzycy i zaburzeń

gospodarki węglowodanowej, obecność nadciśnienia tętniczego. Wiadomo, że zarówno czas trwania niewyrównanej metabolicznie cukrzycy jak i nadciśnienie tętnicze wywierają bezpośredni wpływ na sztywność naczyń [109-111]. Nie bez znaczenia w rozwoju sztywności naczyń wydaje się odgrywać także insulinooporność [112,113]. Z badań Uruskiej i wsp. wiadomo, że powikłania mikronaczyniowe szybciej rozwijają się u pacjentów z typem 1 cukrzycy z klinicznymi i biochemicznymi wykładnikami insulinooporności [63]. Piłaciński i wsp. wykazali z kolei, że mniej stabilny przebieg typu 1 cukrzycy (krótsza remisja) cechuje osoby, które w momencie zachorowania miały wyższą masę ciała, były mniej aktywne fizycznie oraz paliły papierosy [114]. Wszystkie te czynniki zmniejszają wrażliwość tkanek obwodowych na działanie insuliny, m.in. poprzez glikacyjne oraz oksydacyjne uszkodzenia komórek i tkanek. Tak więc u osób z typem 1 cukrzycy, zjawiska te odpowiedzialne są nie tylko za rozwój i progresję przewlekłych powikłań, lecz również prowadzić mogą do rozwoju insulinooporności, przyspieszającej z kolei rozwój zmian naczyniowych. Tan i wsp. wykazali już wcześniej, że stężenie AGEs w surowicy koreluje z insulinoopornością. Zależność ta utrzymywała się nawet po wykluczeniu wpływu wieku, BMI, obwodu talii, palenia papierosów oraz wykładników stresu oksydacyjnego i zapalenia [115]. Sugeruje się, że przyczyną insulinooporności może być glikacja insuliny zmieniająca jej biologiczne własności. Boyd i wsp. wykazali bowiem w warunkach *in vitro*, że pojedyncza glikacyjna modyfikacja fenyloalaniny łańcucha B insuliny powoduje zmniejszenie jej aktywności o ok. 20% [116]. Wyniki własnych badań nie potwierdzają w pełni tej hipotezy, ponieważ dawka egzogennej insuliny w obu grupach badanych (z powikłaniami i bez powikłań) mieściła się w fizjologicznych granicach, poniżej 0,5j/kg m.c./dobę. Nie można jednak wykluczyć, że w okresie lat poprzedzających badanie, dawki insuliny były większe i indukowały wewnątrzkomórkowy proces zapalny

prowadzący do rozwoju insulinooporności i nasilonej hiperglikemii. Dalsze badania prowadzone z użyciem hodowli komórek  $\beta$  wysp trzustki ujawniły, że w następstwie glikacji dochodzić może także do blokowania fosforylacji tyrozyny, substratu receptora insulinowego (IRS), do aktywacji fosfoinozytydo-3-kinazy białkowej oraz upośledzenia wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnału insulinowego [117]. Na podstawie tych badań Goglucci A. wysunął hipotezę, że poprzez glikacyjną modyfikację MAPK zaburzeniu ulegają wewnątrzkomórkowe procesy energetyczne, prowadząc m.in. do nasilenia w wątrobie glukogenezy i lipogenezy, zaburzeń typowych dla zjawiska insulinooporności [118]. W rozwoju insulinooporności nie można również wykluczyć udziału glikacji innych cząsteczek wpływających na metabolizm w mitochondriach.

W badaniach własnych, AF znamienne korelował z antropometrycznymi wykładnikami insulinooporności oraz w sposób ujemny z oszacowanym wskaźnikiem dystrybucji glukozy, wykorzystywanym do oceny wrażliwości tkanek na działanie insuliny w typie 1 cukrzycy. Podobnie ścisłej zależności nie zanotowano przy ocenie innych, pośrednich wykładników zmniejszonej wrażliwości tkanek na działanie insuliny, takich jak wskaźnik VAI czy stosunek TG/HDL w surowicy, pomimo że były one istotnie wyższe u osób z powikłaniami naczyniowymi, aniżeli bez mikroangiopatii. Należy jednak pamiętać, że jedynym złotym standardem dla oceny insulinooporności w typie 1 cukrzycy jest metoda klamry hiperinsulinemiczno-euglikemicznej. Ponieważ jej wykonanie jest drogie i czasochłonne, nie jest wykorzystywana w codziennej praktyce klinicznej. Nie można więc wykluczyć, że użycie bardziej precyzyjnej metody badawczej pozwoliłoby ujawnić jeszcze ściślejszy związek pomiędzy AF, insulinoopornością, sztywnością naczyń i rozwojem typowych powikłań cukrzycy.

W patogenezie przewlekłych powikłań cukrzycy typu 1 zwraca się również uwagę na możliwą w tym zakresie rolę zaburzeń gospodarki lipidowej. W badaniach

własnych zanotowano obecność dodatniej korelacji autofluorescencji skóry ze stężeniem cholesterolu całkowitego, frakcją LDL cholesterolu, frakcją HDL cholesterolu i trójglicerydów. Od dawna wiadomo, że cholesterol całkowity to parametr zmieniający się równoległe do stany kontroli gospodarki węglowodanowej. U wszystkich pacjentów z obecnością powikłań mikronaczyniowych, niezależnie od ich rodzaju, także stężenie trójglicerydów w surowicy było znamienne podwyższone. Fakt ten nie budzi zdziwienia, ponieważ podwyższone stężenie trójglicerydów związane jest z insulinoopornością oraz wątrobową produkcją glukozy. Zaobserwowano ponadto stosunkowo wysokie wartości stężenia frakcji HDL cholesterolu, niezależnie od braku czy obecności klinicznych wykładników mikroangiopatii. W obu grupach pacjentów średnie jej wartości przekraczały próg odcięcia dla rozwoju powikłań. Z wielu badań wynika, że wartości wyższe od 60 mg/dl ograniczają rozwój powikłań naczyniowych w typie 1 cukrzycy [119]. Wysokie wartości frakcji HDL cholesterolu, z jednej strony tłumaczyć można stosowaną insulinoterapią, z drugiej natomiast aktywnością fizyczną tej stosunkowo młodej grupy chorych. Sprawność tej frakcji lipidowej u osób z cukrzycą jest o tyle ważna, że pełni ona rolę układu antyoksydacyjnego, a stresowi oksydacyjnemu przypisuje się dominującą rolę w rozwoju powikłań cukrzycy.

W badaniach własnych, analizując związek AF z poszczególnymi rodzajami powikłań naczyniowych, zaobserwowano że pacjenci, u których rozwinęła się mikroangiopatia byli starsi, o dwukrotnie dłuższym czasie trwania cukrzycy typu 1, mieli też wyższe wartości ciśnienia tętniczego krwi oraz bardziej nasilone pośrednie wykładniki insulinooporności. Charakteryzowali się również wyższą glikowaną hemoglobina, wyższą kumulacją AGEs w skórze oraz gorszym przepływem w mikrokrążeniu nerkowym, ocenianym na podstawie eGFR. Można by więc sugerować, że wiek i czas trwania choroby są zasadniczymi predyktorami rozwoju powikłań. Z

doświadczeń klinicznych wiadomo jednak, że 50 lat trwania niepowikłanej choroby przeżywają pacjenci z typem 1 cukrzycy, którzy są szczupli, aktywni fizycznie, mają zachowaną resztkową sekrecję insuliny, a dobową dawkę egzogennej insuliny nie przekracza 0,5 j/kg m.c./dobę [120]. Analizując ocenianych chorych w badaniach własnych zwraca uwagę fakt, że pacjenci bez powikłań leczenia byli praktycznie od początku choroby metodą intensywnej insulinoterapii, z systemową edukacją i możliwością własnego modulowania dawki insuliny w zależności od wyników samokontroli. Potwierdza to sugestię, że w zakresie prewencji powikłań cukrzycy dominującą rolę odgrywa prawidłowe leczenie od początku choroby. Araszkievicz i wsp. wykazali już wcześniej, że rozwój zmian naczyniowych uzależniony jest od wiedzy o cukrzycy, jaką pacjent nabył na początku choroby [20]. Wszystkich tych możliwości nie posiadał praktycznie chory z typem 1 cukrzycy, która się rozpoczęła w Polsce przed 1995 rokiem, a taką grupę stanowili pacjenci z obecnością jakiegokolwiek powikłania cukrzycowego.

W modelu regresji wieloczynnikowej autofluorescencja skóry ściśle korelowała z neuropatią cukrzycową. Powikłanie to dotyczyło przede wszystkim mężczyzn, osób najstarszych wiekowo, z najgorszym stanem wyrównania metabolicznego i obecnością nadciśnienia tętniczego. Od dawna zwraca się uwagę, że płeć męska sprzyja rozwojowi neuropatii cukrzycowej, zwłaszcza że mężczyźni stanowią grupę osób częściej palącą papierosy i mającą silniej niż kobiety wyrażoną insulinoporność. Nie można jednak wykluczyć udziału czynników hormonalnych w rozwoju tego zjawiska.

Fakt najsilniej wyrażonej zależności pomiędzy AF skóry a neuropatią cukrzycową może budzić zdziwienie, zwłaszcza że uszkodzenia obwodowego i autonomicznego układu nerwowego są wykrywane metodami o małej precyzji i zazwyczaj wówczas, gdy zmiany są na tyle zaawansowane, że ujawniają się klinicznie.

Z drugiej strony wiadomo, że skóra jest bogato unerwiona. Ponadto wykazywano, że w cukrzycy już na wczesnym etapie choroby dochodzi do zaburzeń czynnościowych włókien nerwowych [121]. Jako pierwsze ulegają uszkodzeniu włókna cienkie znajdujące się w skórze nieowłosionej. Regulują one funkcję gruczołów potowych, dlatego też ta czynność jako pierwsza ulega zaburzeniu w warunkach hiperglikemii. Wyprzedza ona, dostępne w badaniu klinicznym, spaczone odczuwanie bólu oraz upośledzenie czucia dotyku i temperatury. Za te zaburzenia odpowiedzialny jest skórny układ nerwowo-immunologiczny. Obejmuje on nie tylko obwodowe włókna nerwowe, lecz również komórki naskórka i skóry właściwej, ujawniające ekspresję neuropeptydów [122].

W patogenezie neuropatii cukrzycowej, oprócz nasilonej glikacji białek w warunkach hiperglikemii, bierze się również pod uwagę nasiloną aktywność przemian glukozy szlakiem poliolowym, zwiększoną ekspresję NFκB oraz szlaku sygnałowego MAPK. Wśród czynników powodujących destrukcję nerwów wymienia się również zwiększoną aktywność polimerazy poli(ADP-rybozy), lipooksygenazy oraz nasilone działanie wymiennika-1  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Większość z rozważanych mechanizmów neuropatii cukrzycowej związana jest ściśle z rozwojem stresu oksydacyjnego, towarzyszącemu zarówno hiper- jak i hipoglikemii [123-125]. Coraz częściej sugeruje się także, że do degeneracji nerwów obwodowych prowadzi upośledzony przepływ w ich naczyniach odżywczych (mikroangiopatia) [126,127]. Wskazywać na to mogą również wyniki badań własnych, które ujawniły, że przesączanie kłębuszkowe nerek związane jest ze stanem przepływu w mikrokrążeniu. Z drugiej strony należy brać pod uwagę fakt, że napięcie ściany mikrokrążenia a tym samym przepływ krwi, regulowany jest przez obwodowy autonomiczny układ nerwowy. Niezależnie jednak od pierwotnej przyczyny, upośledzenie przepływu w małych naczyniach indukuje miejscowe niedotlenienie

wewnątrz neuronu, co zapoczątkowuje proces neurodegeneracji [128,129]. Wyniki uzyskane w badania własnych potwierdzać mogą sugestię Chilleli i wsp., że za rozwój powikłań cukrzycy odpowiedzialna jest dwuetapowa kaskada zjawisk, zapoczątkowana zjawiskiem nasilonej glikacji [130]. W ich opinii, w pierwszym etapie zaburzeń czynności komórek zasadniczą rolę odgrywa zjawisko glikacji, za czym przemawia liniowa zależność pomiędzy hiperglikemią, intensywnością stresu oksydacyjnego i tworzeniem AGEs. W drugim natomiast etapie rozwoju powikłań cukrzycy, powstające nieodwracalne zmiany strukturalne są następstwem przetrwałej glikacji białek łańcucha oddechowego i uszkodzenia DNA, co może być równoznaczne z pamięcią metaboliczną [131]. Sugeruje się również, że dla uruchomienia i podtrzymywania kaskady następujących po sobie zjawisk patogenetycznych, niezbędnych dla rozwoju mikroangiopatii konieczne są zaburzenia równowagi pomiędzy nasileniem stresu oksydacyjnego a pojemnością antyoksydacyjną ustroju. Donoszono już uprzednio, że chorzy na cukrzycę, zarówno z obecnością jak i bez powikłań mają różne potencjały antyoksydacyjne i różną kinetykę procesów oksydacyjnych, uzależnioną od czynników środowiskowych i behawioralnych [132]. Uszkodzenia wywołane stresem oksydacyjnym i nasilonym procesem glikacji, ograniczane być mogą bowiem na różnych etapach ich przebiegu. Niebagatelną w tym zakresie rolę odgrywają wrodzone układy antyoksydacyjne. Jednym z najważniejszych jest układ glutationu [glutation (GSSG) – zredukowany glutation (GSH)]. W warunkach hiperglikemii i towarzyszącego jej stresu oksydacyjnego aktywność układu GSSG-GSH ulega stopniowo wyczerpywaniu [133,134]. Ograniczona regeneracja GSH odpowiedzialna jest m.in. za zmniejszenie możliwości usuwania silnie reaktywnych związków dwuwęglowych będących prekursorem AGEs. Detoksyfikacyjną rolę w tych procesach przypisuje się również reduktazie aldozy. Jej wykorzystywanie ogranicza jednak



nasiloną w warunkach hiperglikemii aktywność przemiany glukozy torem polioliowym. Tak więc prawidłowa kontrola metaboliczna cukrzycy może również na tej drodze zabezpieczać sprawność układów antyoksydacyjnych ustroju. W warunkach fizjologicznych, istnieją w ustroju również inne systemy antyglykacyjne, ograniczające zaburzenia czynności i struktury komórek. Należą do nich lizosomy i proteasomy, które zapobiegają gromadzeniu się wewnątrzkomórkowo glikowanych białek, a także frakcja HDL cholesterolu [135]. Wartość tej frakcji lipidowej obserwowana w badaniach własnych, wskazywać może na zachowaną jeszcze ochronę antyoksydacyjną.

Trwają intensywne poszukiwania, poza wyrównaniem zaburzeń gospodarki węglowodanowej, skutecznych metod ograniczających uszkodzenia mikrokrążenia i obwodowych włókien nerwowych. Na podstawie wielu badań wiadomo bowiem, że przynajmniej częściowo jest to zjawisko odwracalne. Wykazano korzystny efekt w tym zakresie kwasu liponowego i benfogammy [136-138]. Sugeruje się również, że blokada układu renina-angiotensyna może wpływać na ograniczenie niekorzystnych następstw zjawiska glikacji [139]. Należy zwrócić uwagę, że aż 39 % osób badanych przyjmowało leki z tej grupy, co niewątpliwie mogło mieć wpływ na uzyskane wyniki. Wykazywano także, że zjawiska glikacji mogą być ograniczane przez systematyczny wysiłek fizyczny [140].

W podsumowaniu można więc stwierdzić, że pomimo dużej grupy ocenianych osób z typem 1 cukrzycy, nie na wszystkie stawiane pytania można odpowiedzieć. Zbyt wiele bowiem czynników wpływa na przebieg choroby i rozwój jej przewlekłych powikłań. Z całą pewnością można jednak sugerować, że ocena autofluorescencji skóry jest prostą, bezpieczną i nieinwazyjną metodą, pozwalającą na prowadzenie badań przesiewowych u osób z typem 1 cukrzycy w kierunku obecności mikroangiopatii, a zwłaszcza przydatną dla wczesnego rozpoznawania, sprawiającej trudności

diagnostyczne neuropatii. Celem potwierdzenia tego punktu widzenia, konieczne są jednak dalsze analizy pozwalające na udzielenie odpowiedzi, które z powikłań rozwija się jako pierwsze, a tym samym na jakiej drodze można jeszcze ograniczyć ich progresję.

## **WNIOSKI**

1. Osoby z cukrzycą typu 1 powikłaną mikroangiopatią cukrzycową charakteryzują się nasilonym gromadzeniem zaawansowanych produktów glikacji białek w skórze ocenianych za pomocą autofluorescencji skóry.
2. Zwiększona zawartość AGEs w skórze u osób z typem 1 cukrzycy wiąże się nie tylko z obecnością retinopatii, neuropatii, cukrzycowej choroby nerek czy jakiegokolwiek mikroangiopatii, lecz również wskazuje na współistnienie insulinooporności.
3. U osób z cukrzycą typu 1 zawartość zaawansowanych produktów glikacji białek w skórze związana jest w dominujący sposób z neuropatią.
4. Ocena autofluorescencji skóry wywołana gromadzeniem zaawansowanych produktów glikacji białek jest prostą, bezpieczną i nieinwazyjną metodą pozwalającą na ocenę stopnia zaawansowania mikronaczyniowych powikłań cukrzycy.

## **STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM**

### **Wstęp**

Pomimo znacznego postępu w leczeniu cukrzycy, nadal przewlekłe powikłania schorzenia, zarówno o charakterze mikro- jak i makroangiopatii, stanowią istotny problem kliniczny. Tradycyjne czynniki ryzyka angiopatii cukrzycowej, takie jak: hiperglikemia, dyslipidemia, czas trwania choroby, palenie papierosów, nadciśnienie tętnicze, nie w pełni tłumaczą rozwój i progresję powikłań naczyniowych cukrzycy. Dlatego poszukuje się nowych markerów prognostycznych dla mikro- i makroangiopatii cukrzycowej. Tworzenie zaawansowanych produktów glikacji białek (AGEs) odgrywa istotną rolę w patogenezie powikłań naczyniowych cukrzycy.

### **Cel**

Celem pracy jest ocena przydatności klinicznej pomiaru autofluorescencji skóry wywołanej gromadzeniem się zaawansowanych produktów glikacji białek u pacjentów z cukrzycą typu 1. Postanowiono ustalić również jej związek ze stopniem wyrównania metabolicznego cukrzycy, pośrednimi wykładnikami insulinooporności i z obecnością mikroangiopatii cukrzycowej, w tym neuropatii cukrzycowej.

### **Material i metody**

Do badania włączono 608 kolejnych osób (289 mężczyzn i 319 kobiet) z cukrzycą typu 1, hospitalizowanych w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, w latach 2012-2013. Średni czas trwania choroby wynosił 14 (9-22) lat. W badanej grupie oceniono stopień wyrównania metabolicznego cukrzycy, wskaźniki insulinooporności oraz obecność mikroangiopatii, w tym neuropatii cukrzycowej. Przeprowadzono nieinwazyjne badanie akumulacji zaawansowanych produktów glikacji w tkankach na podstawie poziomu autofluorescencji skóry z zastosowaniem urządzenia AGE-Reader (DiagnOptics

Technologies B.V., Holandia). Wskaźnik autofluorescencji (AF) jest ilorazem średniego natężenia światła emitowanego w zakresie fali 420-600nm do średniego natężenia światła w zakresie fali 300-420nm.

## **Wyniki**

W trakcie oceny pacjentów z typem 1 cukrzycy cukrzycową chorobę nerek rozpoznano u 106 pacjentów (17%), retinopatię cukrzycową u 270 osób (44%) oraz neuropatię cukrzycową u 118 pacjentów (19%). Jakąkolwiek mikroangiopatię, definiowaną jako obecność przynajmniej jednego z powyższych powikłań, rozpoznano u 296 pacjentów (49%). Wartość HbA1c wynosiła 7.8 (7.0-8.9)%. Średnia wartość wskaźnika autofluorescencji skóry w badanej grupie wynosiła 2.3 (1.9-2.7). Uzyskano dodatnią korelację pomiędzy wartością AF a wiekiem pacjentów ( $R_s=0.58$ ,  $p<0.001$ ), czasem trwania choroby ( $R_s=0.41$ ,  $p<0.001$ ) oraz ujemną korelację pomiędzy AF a wartością oszacowanego wskaźnika dystrybucji glukozy (eGDR) ( $R_s=-0.28$ ,  $p<0.001$ ). AF był istotnie wyższy u osób z powikłaniami naczyniowymi w porównaniu do pacjentów bez przewlekłych powikłań choroby: w przypadku cukrzycowej choroby nerek [2.4 (2.1-2.8) vs 2.2 (1.9-2.6),  $p<0.001$ ], retinopatii cukrzycowej [2.4 (2.1-2.9) vs 2.1(1.8-2.4),  $p<0.001$ ], neuropatii [2.7 (2.3-3) vs 2.1 (1.9-2.5),  $p<0.001$ ] oraz jakiegokolwiek mikroangiopatii cukrzycowej [2.4 (2.1-2.8) vs 2.1(1.8-2.3),  $p<0.001$ ]. W modelu regresji wieloczynnikowej wykazano niezależny związek AF skóry tylko z obecnością neuropatii cukrzycowej [OR 1.94 (95%CI: 1.18-3.20),  $p<0.001$ ].

## **Wnioski**

Osoby z cukrzycą typu 1, powikłaną mikroangiopatią cukrzycową, charakteryzują się nasilonym gromadzeniem zaawansowanych produktów glikacji białek w skórze, ocenianych za pomocą autofluorescencji skóry. Zwiększona zawartość AGEs w skórze u osób z typem 1 cukrzycy wiąże się nie tylko z obecnością retinopatii,

neuropatii, cukrzycowej choroby nerek czy jakiegokolwiek mikroangiopatii, lecz również wskazuje na współistnienie insulinooporności. U osób z cukrzycą typu 1 zawartość zaawansowanych produktów glikacji białek w skórze związana jest w dominujący sposób z neuropatią. Ocena autofluorescencji skóry wywołana gromadzeniem zaawansowanych produktów glikacji białek jest prostą, bezpieczną i nieinwazyjną metodą pozwalającą na ocenę stopnia zaawansowania mikronaczyniowych powikłań cukrzycy.

## **STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM**

### **Introduction**

Despite significant progress in the treatment of diabetes, chronic complications, both micro - and macrovascular, are still an important clinical problem. Traditional risk factors for diabetic angiopathy, such as hyperglycemia, dyslipidemia, duration of disease, smoking and hypertension do not fully explain the development and progression of vascular complications of diabetes. Therefore, new prognostic markers for diabetic micro - and macroangiopathy are being searched. Formation of advanced glycation end products (AGEs) plays an important role in the pathogenesis of vascular complications of diabetes.

### **Aim**

The aim of the study was to evaluate the clinical usefulness of the measurement of skin autofluorescence (AF) caused by the accumulation of advanced glycation end products, in patients with type 1 diabetes. It was also decided to establish the relationship between skin autofluorescence and the degree of metabolic control of diabetes, insulin resistance and the presence of diabetic microangiopathy, including diabetic neuropathy.

### **Material and methods**

The study was entered by 608 consecutive patients with type 1 diabetes (289 men and 319 women), hospitalized in the Department of Internal Medicine and Diabetology, Poznan University of Medical Sciences in years 2012-2013. Mean disease duration was 14 (9-22) years. We evaluated the metabolic control of diabetes, indirect markers of insulin resistance and the presence of microangiopathy including neuropathy. We used AGE Reader (DiagnOptics, Technologies B.V., Netherlands) to measure skin autofluorescence phenomenon, which occurs because of fluorescent

properties of AGE. Skin autofluorescence is expressed as the ratio of the average intensity of light emitted in the wavelength range of 420-600nm to the average light intensity in the wavelength range of 300-420nm.

## **Results**

Diabetic kidney disease was diagnosed in 106 patients (17%), neuropathy in 118 patients (19%), diabetic retinopathy in 270 patients (44%). Any microangiopathy, defined as the presence of at least one of these complications, was diagnosed in 296 patients (49%). A1C level was 7.8 (7.0-8.9) %. The median AF was 2.3 (1.9-2.7). We found a positive correlation between AF and patients' age ( $R_s=0.58$ ,  $p<0.001$ ), diabetes duration ( $R_s=0.41$ ,  $p<0.001$ ). A negative correlation was found between AF and estimated glucose disposal rate (eGDR) ( $R_s=-0.28$ ,  $p<0.001$ ). Skin AF was significantly higher in patients with vascular complications as compared to patients without chronic complications of the disease: both for diabetic kidney disease [2.4 (2.1-2.8) vs 2.2 (1.9-2.6),  $p<0.001$ ], diabetic retinopathy [2.4 (2.1-2.9) vs 2.1 (1.8-2.4),  $p<0.001$ ], neuropathy [2.7 (2.3-3) vs 2.1 (1.9-2.5),  $p<0.001$ ] and for any diabetic microangiopathy [2.4 (2.1-2.8) vs 2.1 (1.8-2.3),  $p<0.001$ ]. In the multivariate regression model we found an independent association between skin AF and the presence of diabetic neuropathy [OR 1.94 (95%CI: 1.18-3.20),  $p<0.001$ ].

## **Conclusions**

Patients with type 1 diabetes and microangiopathy are characterized by the increased accumulation of advanced glycation end products in the skin assessed by skin autofluorescence. Increased accumulation of AGEs in the skin in patients with type 1 diabetes is associated not only with the presence of retinopathy, neuropathy, diabetic kidney disease or any microangiopathy, but also indicates the co-existence of insulin resistance. In patients with type 1 diabetes the content of advanced glycation end



products in the skin is associated primarily with neuropathy. The assessment of skin autofluorescence caused by the accumulation of advanced glycation end products is a simple, safe and non-invasive method, which allows the evaluation of the degree of severity of microvascular complications of diabetes.

## PIŚMIENNICTWO

1. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025:prevalence,numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; 21(9): 1414-1431.
2. [www.idf.org/diabetesatlas](http://www.idf.org/diabetesatlas)
3. Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannel WB. Morbidity and mortality In diabetics In the Framingham population. Sixteen year follow- up study. *Diabetes* 1974;23(2):105-111.
4. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-year cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993; 16(2): 434-444.
5. Wikblad K, Leksell J, Wibell L. Health- related guality of life in relation to metabolic control and late complications in patients with insulin dependent diabetes mellitus. *Qual Life Res.*1996; 5(1): 123-130.
6. Brown GC, Brown MM, Sharma S, Brown H, Gozum M, Denton P. Quality of life associated with diabetes mellitus in an population. *J Diabetes Complications* 2000; 14(1): 18-24.
7. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD i wsp. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin- treated diabetes. *Diabetologia* 2003; 46(6): 760-765.
8. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD i wsp. The British Diabetic Association Cohort Study, II: cause- specific mortality in patients with insulin- treated diabetes mellitus. *Diabet Med.* 1999; 16(6): 466-471.

9. Koivisto VA, Stevens LK, Mattock M i wsp. Cardiovascular disease and its risk factors in IDDM in Europe. EURODIAB IDDM Complications Study Group. *Diabetes Care* 1996; 19(7): 689-697.
10. Krishnan S, Short KR. Prevalence and significance of cardiometabolic risk factors in children with type 1 diabetes. *J Cardiometab Syndr.* 2009; 4(1): 50-56.
11. Ceriello A. The possible role of postprandial hyperglycaemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetologia* 2003; 46(suppl 1): M9-M16.
12. Ceriello A. The post-prandial state and cardiovascular disease: relevance to diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev.* 2000; 16: 125-132.
13. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin- dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med.* 1993; 329(14): 977-986.
14. Standards of medical care in diabetes-2007. *Diabetes Care* 2007; Suppl 1: S4-S41.
15. De Winther MP, Kanters E, Kraal G, Hofker MH. Nuclear Factor kB Signaling In Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 904-914.
16. Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ i wsp. Von Willebrand Factor, C-Reactive protein, and 5-Year Mortality in Diabetic and nondiabetic Subjects. The Hoorn Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 3071-3078.
17. Schalkwijk CG, Chaturvedi N, Twaafhoven H, van Hinsbergh VW, Stehouwer CD. Amadori – albumin correlates with microvascular complications and precedes nephropathy in type 1 diabetic patients. EUCLID Study Group. *Eur J Clin Invest.* 2002; 32: 500-506.
18. Berger M, Muhlhauser I. Implementation of intensified insulin therapy: a European perspective. *Diabet Med.* 1995; 12(3): 201-208.

19. Muhlhauser I, Bruckner I, Berger M i wsp. Evaluation of an intensified insulin treatment and teaching programme as routine management of type 1 (insulin-dependent) diabetes. The Bucharest-Dusseldorf study. *Diabetologia* 1987; 30(9): 681-90.
20. Araszkiwicz A, Zozulinska-Ziolkiewicz D, Trepinska M, Wierusz- Wysocka B. Knowledge after five-day teaching program in intensive insulin therapy performed at the onset of type 1 diabetes influences the development of late diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008; 81(1): 61-67.
21. Pieber TR, Brunner GA, Schnedl WJ, Schatteneberg S, Kaufmann P, Krejs GJ. Evaluation of a structured outpatient group education program for intensive insulin therapy. *Diabetes Care* 1995; 18(5): 61-67.
22. Samann A, Muhlhauser I, Bender R, Kloos C, Muller UA. Glycaemic control and severe hypoglycaemia following training in flexible, intensive insulin therapy to enable dietary freedom in people with type 1 diabetes: a prospective implementation study. *Diabetologia* 2005; 48(10): 1965-1970.
23. Araszkiwicz A, Zozulinska- Ziolkiewicz D, Trepinska M, Wierusz- Wysocka B. Is intensive functional insulin therapy the method of choice in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus? *Pol Merkur Lekarski* 2004; 48(10): 1965-1970.
24. Lemozy-Cadroy S, Crognier S, Gourgy P i wsp. Intensified treatment of type 1 diabetes: prospective evaluation at one year of a therapeutic patient education programme. *Diabetes Metab.* 2002; 28(4 Pt1): 287-294.
25. Martin CL, Albers J, Herman W i wsp. Neuropathy Among the Diabetes Control and Complications Trial Cohort 8 Years After Trial Completion. *Diabetes Care* 2006; 29(2): 340-344.

26. Gaudreault N, Scriven DR, Moore ED. Characterization of glucose transporters in the intact coronary artery endothelium in rats: GLUT-2 up-regulated by the long-term hyperglycaemia. *Diabetologia* 2004; 47: 2081-88.
27. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and development of diabetic complications. *Diabetes* 1998; 47: 859-866.
28. Zozulińska D. Rola procesu zapalnego ze szczególnym uwzględnieniem granulocytów obojętnochłonnych w rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy. Praca habilitacyjna, Poznań 2001.
29. Brownlee M. Glycation and diabetic complication. *Diabetes* 1994; 43: 836-841.
30. Giugliano D, Ceriello A. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19: 257-267.
31. Singh R, Barden A, Bellin L. Advanced glycation and products: a review. *Diabetologia* 2001; 44: 129-146.
32. Stehouwer CD, Lambert J, Donker AJM, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovascular Research* 1997; 34: 55-68.
33. Brownlee M. Biochemistry molecular cell biology of diabetic complication. *Nature* 2001; 414: 813-820.
34. Nishikawa T, Edelstein D, Du X- L i wsp. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathway of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404: 787-790.
35. Ferrara N, Davis- Smyth T. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Rev.*1997; 18: 4-25.
36. McClian DA. Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes. *Diabet Compl. J.* 2002; 16: 72-75.

37. Taguchi T, Brownlee M. The biochemical mechanisms of diabetes tissue damage. In: textbook of Diabetes. Selected Chapters. J. C. Pickup, G. Williams. Blackwell Publ. Ltd. 2005;47.1.
38. Zozulinska D, Wierusz- Wysocka B, Wysocki H, Majchrzak A, Wykretowicz A. The influence of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) on superoxide anion and hydrogen peroxide production by polymorphonuclear neutrophils. *Diabet Res Clin Pract.* 1996; 33: 139-144.
39. Zozulinska D, Wierusz- Wysocka B. Type 2 diabetes mellitus as inflammatory disease. *Diabet Res Clin Pract.* 2006; 74S: S12-S16.
40. Rosca MG, Mustata TG, Kinter MT, Ozdemir AM, Kern TW, Szweda LI. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Am J Physiol.* 2005; 289: 1420-1430.
41. Ihnat MA, Thorpe JE, Ceriello A. Hypothesis: the metabolic memory, the New challenge of diabetes. *Diabet Med.* 2007; 24: 582-586.
42. Wierusz-Wysocka B, Zozulińska D. Wybrane mechanizmy patogenetyczne przewlekłych powikłań cukrzycy. Rola dysfunkcji śródbłonna. *Diabetologia Pol.* 2002; 7: 193-198.
43. Vlassara H. Recent progress in advanced glycation and products and diabetic complications. *Diabetes* 1997; 46(supl.2): 19-24.
44. Wierusz-Wysocka B, Zozulińska D, Kempa M, i wsp. Ocena stężenia metabolitów tlenu azotu u chorych z typem 1 cukrzycy. *PAMW* 1998; 100: 139-143.
45. Chan NN, Vallance P, Colhun HM. Nitric oxide and vascular responses in type 1 diabetes. *Diabetologia* 2000; 43: 137-147.
46. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068-2101.

47. De Winther MP, Kanters E, Kraal G, Hofker MH. Nuclear Factor  $\kappa$ B Signaling In Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 904-914.
48. Wierusz-Wysocka B, Wykretowicz A, Byks H, Sadurska K, Wysocki H. Polymorphonuclear neutrophils adherence, superoxide anion production ( $O_2^-$ ) and HbA1c level in diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 1993; 2: 109-114.
49. Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 1995; 16: 21-26.
50. Larson RS, Springer TA. Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev.* 1990; 114: 181-186.
51. Clausen P, Jacobsen P, Rossing K i wsp. Plasma concentrations of VCAM and ICAM-1 are elevated in patients with type 1 diabetes mellitus with microalbuminuria and overt nephropathy. *Diab Med.* 2000; 17: 644-649.
52. Ley K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res.* 1996; 32: 733-742.
53. Roitt I, Brostoff J, Male D. Migracja komórek i zapalenie. W: *Immunologia*. Wyd. J. Żeromski. Wydawnictwo Medyczne Słowiński Verlag, Brema 1996, 14.1-14.9.
54. Schmid- Schonbein GW. The damaging potential of leukocyte activation in the microcirculation. *Angiology* 1993; 44: 45-56.
55. Wierusz-Wysocka B, Zozulinska D, Wysocki H. Odczyn zapalny w patogenezie mikro- i makroangiopatii cukrzycowej. *Med Sci Rev.* 2002; 1: 56-62.
56. Williams KV, Erbey JR, Becker D, Arslanian S, Orchard TJ. Can clinical factors estimate insulin resistance in type 1 diabetes? *Diabetes* 2000; 49(4): 626-632.
57. Stern SE, Williams K, Ferrannini E, DeFronzo RA, Bogardus C, Stern MP. Identification of individuals with insulin resistance using routine clinical measurements. *Diabetes* 2005; 54(2): 333-339.

58. McLaughlin T, Abbasi F, Cheal K, Chu J, Lamendola C, Reaven G. Use of metabolic markers to identify overweight individuals who are insulin resistant. *Ann Intern Med.* 2003; 139(10): 802-809.
59. Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkin SL. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and complication risk in type 1 diabetes: “double diabetes” in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 2007; 30(3): 707-712.
60. Thorn LM, Forsblom C, Fagerudd J i wsp. Metabolic syndrome in type 1 diabetes: association with diabetic nephropathy and glycemic control (the FinnDiane study). *Diabetes Care* 2005; 28(8): 2019-2024.
61. Pambianco G, Costacou T, Orchard TJ. The prediction of major outcomes of type 1 diabetes: a 12- year prospective and their components and estimated glucose disposal rate: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience. *Diabetes Care* 2007; 30(5): 1248-1254.
62. Orchard TJ, Olson JC, Erbey JR i wsp. Insulin resistance- related factors, but not glycemia, predict coronary artery disease in type 1 diabetes: 10- year follow- up data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes Care* 2003; 26(5): 1374-1379.
63. Uruska A, Araszkiwicz A, Zozulinska-Ziolkiewicz D, Uruski P, Wierusz- Wsocka B. Insulin resistance is associated with microangiopathy in type diabetic patients treated with intensive insulin therapy from the onset of disease. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010; 118(8): 478-484.
64. Orchard TJ, Chang YF, Ferrell RE, Petro N, Ellis DE. Nephropathy in type 1 diabetes: a manifestation of insulin resistance and multiple genetic susceptibilities? Further evidence from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complication Study. *Kidney Int.* 2002; 62(3): 963-970.



65. Ekstrand AV, Groop PH, Gronhagen-Riska C. Insulin resistance precedes microalbuminuria in patients with insulin- dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant.* 1998; 13(12): 3079-3083.
66. Chillaron JJ, Goday A, Flores-Le-Roux JA i wsp. Estimated glucose disposal rate in assessment of the metabolic syndrome and microvascular complications in patients with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(9): 3530-3534.
67. Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Ann Rev Med.* 1995; 46: 223-234.
68. Brett J, Schmidt AM, Yan SD i wsp. Survey of distribution of a new characterized receptor for advanced glycation end products in tissue. *Am J Pathol.* 1993; 143: 1699-1712.
69. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* 2010; 107(9): 1058-1070.
70. Li Poon PB, Muphy MP. Pathological significance of mitochondria glycation. *Int J Cell Biol.* 2012;doi: 10.1155/2012/843505.
71. Neumann A, Schnizel R, Palm D, Riederer P, Munch G. High molecular weight hialuronic acid inhibits advanced glycation endproducts induced NF-kappa B activation and cytokine expression. *FEBS Lett.* 1999; 453: 283-287.
72. Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res.* 2004; 63: 582-592.
73. Ziemann S, Kass DA. Advanced glycation end products crosslinking in the cardiovascular system: potential therapeutic target for cardiovascular disease. *Drug* 2004; 64: 459-470.

74. Lutgers HL, Gerrits EG, Graft R i wsp. Skin autofluorescence provides additional information to the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) risk score for the estimation of cardiovascular prognosis in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2005; 52(5): 789-797.
75. Meerwaldt R, Lutgers HL, Links TP i wsp. Skin autofluorescence is a strong predictor of cardiac mortality in diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30(1): 107-112.
76. Bos DC, Wendela L, de Ranitz-Greven, de Valk HW. Advanced glycation end products, measured as skin autofluorescence and diabetes complications: a systematic review. *Diabetes Technol Ther.* 2011; 13(7): 773-779.
77. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol.* 1979; 237(3): E214-223.
78. Amato MC, Giordano C, Galia M i wsp. AlkaMeSy Study Group. Visceral Adiposity Index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care* 2010; 33(4): 920-922.
79. Wilkinson CP, Ferris FL 3rd, Klein RE i wsp. Global Diabetic Retinopathy Project Group. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology* 2003; 110(9): 1677-1682.
80. KDOQI. Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis.* 2007; 49 (Suppl 2): S12-154.
81. Jorgensen ME, Almdal TE, Carstensen B. Time trends in mortality rates in type 1 from 2002 to 2011. *Diabetologia* 2013; 56: 2401-2404.
82. Krall LP, Levine R, Barnett D. The history of diabetes. „Joslin’s Diabetes mellitus”, wyd. C.R.Kahn, Weir G.C; Lea & Febiger, Philadelphia-Baltimore-Hong Kong-London-Munich-Sydney-Tokyo, A Waverly Co 1994, 1-4.

83. Tolstoi E. The Practical Management in Diabetes. Wyd. I.L. Springfield; Thomas Publications, 1953.
84. Rosenstock J, Raskin P. Diabetes and its complications: blood glucose control vs. Genetic susceptibility. *Diabet Metab Rev.* 1988; 4: 417-435.
85. EDIC Research Group. Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC). Design, implementation, and preliminary results of a long-term follow-up of the Diabetes Control and Complications Trial cohort. *Diabetes Care* 1999; 22(1): 99-111.
86. Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R i wsp. Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. The role protein kinase C and NAD(P)H oxidase activation. *Diabetes* 2003; 52: 2795-2804.
87. El-Osta A, Brasacchio D, Yao D i wsp. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med.* 2008; 205(10): 2409-2417.
88. Aroda VR, Conway BN, Fernandez SJ i wsp. Cross-sectional evaluation of noninvasively detected skin intrinsic fluorescence and mean hemoglobin A1c in type 1 diabetes. *Diabetes Technol Ther.* 2013; 15(2): 117-123.
89. Kulkarni RN. Identifying biomarkers of subclinical diabetes. *Diabetes* 2012; 61(8): 1925-1926.
90. Wierusz-Wysocka B, Araszkiwicz A, Schlaffke J. Końcowe produkty glikacji (advanced glycation end products-AGE)-czy nowy biomarker cukrzycy i jej powikłań? *Diabetologia Kliniczna* 2013; T.2, nr 3, 96-103.

91. Genuth S, Sun W, Celary P i wsp. DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group. Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the diabetes control and complications trial and epidemiology of diabetes interventions and complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54(11): 3103-3111.
92. Kerkeni M, Saidi A, Bouzidi H, Letaief A, Ben Yahia S, Hammami M. Pentosidine as a biomarker microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diab Vasc Dis Res.* 2013; 10(3): 239-245.
93. Monnier VM, Bautista O, Kenny D i wsp. Skin collagen glycation, glycooxidation, and crosslinking are lower subjects with long-term intensive versus conventional therapy of type 1 diabetes: relevance of glycated collage products versus HbA1c as markers of diabetic complications. DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group. *Diabetes Control and Complications Trial.* *Diabetes* 1999; 48: 870-880.
94. Yu Y, Thorpe SR, Jenkins AJ i wsp. Advanced glycation end-products and methionine sulphoxide in skin collagen of patients with type 1 diabetes. DCCT/EDIC Research Group. *Diabetologia* 2006; 49(10): 2488-2498.
95. Genevieve M, Vivot A, Gonzalez C i wsp. Skin autofluorescence is associated with past glycaemic control and complications in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 2013; 39(4): 349-354.
96. Samborski P, Naskret D, Araszkiwicz A, Niedzwiecki P, Zozulinska-Ziolkiewicz D, Wierusz-Wysocka B. Assessment of skin autofluorescence as a marker of advanced glycation end product accumulation in type 1 diabetes. *Pol Arch Med Wewn.* 2011; 121(3): 67-72.

97. King PS, Berg CA, Butner J i wsp. Longitudinal trajectories of metabolic control across adolescence: associations with parental involvement, adolescents' psychosocial maturity, and health care utilization. *J Adolesc Health*. 2012; 50(5): 491-496.
98. Demirel F, Tepe D, Kara O, Esen I. Microvascular complications in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2013; 5(3): 145-149.
99. Frøisland DH, Graue M, Markestad T i wsp. Health-related quality of life among Norwegian children and adolescents with type 1 diabetes on intensive insulin treatment: a population-based study. *Acta Paediatr*. 2013; 102(9): 889-895.
100. Araszkievicz A, Naskret D, Niedzwiecki P, Samborski P, Wierusz-Wysocka B, Zozulinska-Ziolkiewicz D. Increased accumulation of skin advanced glycation end products is associated with microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes Technol Ther*. 2011; 13(8): 837-842.
101. Conway BN, Aroda VR, Maynard JD i wsp. Skin intrinsic fluorescence correlates with autonomic and distal symmetrical polyneuropathy in individuals with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2011; 34(4): 1000-1005.
102. Cleary PA, Braffett BH, Orchard T i wsp. DCCT/EDIC Research Group. Clinical and technical factors associated with skin intrinsic fluorescence in subjects with type 1 diabetes from the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study. *Diabetes Technol Therap* 2013; 15(6): 466-474.
103. Shah S, Baez EA, Felipe DL, Maynard JD, Hempe JM, Chalew SA. Advanced glycation endproducts in children with diabetes. *J Pediatr*. 2012; 163(6): 1427-1431.

104. Cerami A, Vlassara H, Brownlee M. Glucose und al tern. Spectrum der Wissenschaft 1987; 17: 44-51.
105. Rogowicz-Frontczak A, Araszkiwicz A, Pilacinski S, Zozulinska-Ziolkiewicz D, Wykretowicz A, Wierusz-Wysocka B. Carotid intima-media thickness and arterial stiffness in type 1 diabetic patients with and without microangiopathy. Arch Med Sci. 2012; 8(3): 484-490.
106. Januszewski AS, Sachithanandan N, Karschimkus C i wsp. Non-invasive measures of tissue autofluorescence are increased in Type 1 diabetes complications and correlate with a non-invasive measure of vascular dysfunction. Diabet Med. 2012; 29(6): 726-733.
107. Mikulikova K, Eckhardt A, Kunes J, Zicha J, Miksik I. Advanced glycation end-product pentosidine accumulates in various tissues rats with high fructose intake. Physiol Res. 2008; 57(1): 89-94.
108. Seirafi H, Farsinejad K, Firooz A i wsp. Biophysical characteristics of skin in diabetes: a controlled study. Eur Acad Dermatol Venerol. 2009; 23: 146-149.
109. Oxlund H, Rasmussen LM, Andreassen TT, Heickendorff L. Increased aortic stiffness in patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. Diabetologia 1989; 32(10): 748-752.
110. Sims TJ, Rasmussen LM, Oxlund H, Bailey AJ. The role of glycation cross-links in diabetic vascular stiffening. Diabetologia 1996; 39(8): 946-951.
111. Dabelea D, Talton JW, D'Agostino R Jr i wsp. Cardiovascular Risk Factors Are Associated With Increased Arterial Stiffness in Youth With Type 1 Diabetes: The SEARCH CVD study. Diabetes Care 2013 [ahead of print].

112. Shimizu Y, Nakazato M, Sekita T i wsp. Association of arterial stiffness and diabetes with triglycerides-to-HDL cholesterol ratio for Japanese men: the Nagasaki Islands Study. *Atherosclerosis*.2013; 228(2): 491-495.
113. Theilade S, Lajer M, Persson F i wsp. Arterial stiffness is associated with cardiovascular, renal, retinal, and autonomic disease in type 1 diabetes.*Diabetes Care* 2013; 36(3): 715-721.
114. Pilacinski S, Adler AI, Zozulinska-Ziolkiewicz DA, Gawrecki A, Wierusz-Wysocka B. Smoking and other factors associated with short-term partial remission of Type 1 diabetes in adults. *Diabet Med*. 2012; 29(4): 464-469.
115. Tan KC, Shiu SW, Wong Y, Tam X. Serum advanced glycation end products (AGEs) are associated with insulin resistance. *Diabetes Metab Res Rev*. 2011; 27: 488-492.
116. Boyd AC, Abdel-Wahab YH, McKillop AM i wsp. Impaired ability of glycated insulin to regulate plasma glucose and stimulate glucose transport and metabolism in mouse abdominal muscle. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1523: 128-134.
117. Fiory F, Lombardi A, Miele C i wsp. Methylglyoxal impairs insulin signalling and insulin action on glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cell line INS-1E. *Diabetologia* 2011; 54: 2941-2952.
118. Goglucci A. “Blinding” of AMP-dependent kinase by methylglyoxal: the mechanisms that allows perpetuation of hepatic insulin resistance? *Med Hypotheses* 2009; 73: 921-924.
119. Wierusz-Wysocka B, Zozulinska D, Araszkiwicz A, Pisarczyk-Wiza D. Higher Levels of HDL Cholesterol Are Associated With a Decreased Likelihood of Albuminuria in Patients With Long-Standing Type 1 Diabetes. Response to Molitch et al. *Diabetes Care* 2006; 29: 1176-1177.

120. Keenan HA, Sun JK, Levine J i wsp. Residual insulin production and pancreatic  $\beta$ -cell turnover after 50 years of diabetes: Joslin Medalist Study. *Diabetes* 2010; 59(11): 2846-2853. Yasuda H, Terada M, Meada K i wsp. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Prog Neurobiol.* 2003; 69(4): 229-285.
121. Sun PC, Kuo CD, Chi LY, Lin HD, Wei SH, Chen CS. Microcirculatory vasomotor changes are associated with severity of peripheral neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Diabet Vasc Dis Res.* 2013; 10: 270-276.
122. Syze van Dam P, Cotter MA, Bravenboer B, Vameron NE. Pathogenesis of diabetic neuropathy: fokus on neurovascular mechanisms. *Eur J Pharmacol* 2013; doi: 10.1016/j.ejphar.2013.07.017.
123. Kumar A, Negi G, Sharma SS. Suppression of NF- $\kappa$ B and NF- $\kappa$ B regulated oxidative stress and neuroinflammation by BAY 11-7082 (I $\kappa$ B phosphorylation inhibitor) in experimental diabetic neuropathy. *Biochemie* 2012; 94(5): 1158-1165.
124. Ge X, Shi Z, Yu N, Jiao Y, Jin L, Zhang J. The Role of EGFR/ERK/ELK-1 MAP Kinase Pathway in the Underlying Damage to Diabetic Rat Skin. *Indian J Dermatol.* 2013; 58(2): 101-106.
125. Malik RA, Tesfeye S, Thomson SD, Veves A. Transepineural capillary abnormalities in the sural nerve of patients with diabetic neuropathy. *Microvasc Res.* 1994; 48: 236-242.
126. Giannini C, Dyck PJ. Basement membrane reduplication and pericyte degeneration precede development of diabetic polyneuropathy and are associated with its severity. *Ann Neurol.* 1995; 37: 498-504.
127. Ibrahim S, Harris ND, Radatz M i wsp. A new minimally invasive technique to show nerve ischemia in diabetic neuropathy. *Diabetologia* 1999; 42(6): 737-742.



128. Himeno T, Kamiya H, Naruse K i wsp. Beneficial effects of exendin-4 on experimental polyneuropathy in diabetic mice. *Diabetes* 2011; 60: 2397-2406.
129. Chilelli NC, Burlina S, Lapolla A. AGEs, Rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: A glycooxidation-centric” poin of view. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013; 23: 913-919.
130. Cierello A, Inhat MA, Thorpe JE. The metabolic memory: is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94: 410-415.
131. Lapolla A, Tubaro M, Reitano R i wsp. The complexity of non-enzymatic glycation product sets of human globins. *Diabetologia* 2004; 47: 1712-1715.
132. Berner AK, Brouwers O, Pringle R i wsp. Protection against methylglyoxal-derived AGEs by regulation of glyoxalase 1 prevents retinal neuroglial and vasodegenerative pathology. *Diabetologia* 2012; 55(3): 845-854.
133. Majchrzak A, Zozulinska D, Wierusz-Wysocka B. Ocena wybranych układów antyoksydacyjnych we krwi chorych na cukrzycę. *Pol Merkur Lekarski* 2001; 10(57): 150-152.
134. Queisser MA, Yao D, Geisler S i wsp. Hyperglycemia impairs proteasome function by methylglyoxal. *Diabetes* 2010; 59(3): 670-678.
135. Thirunavukkarasu V, Nandhini AT, Anuradha CV. Fructose diet induced skin collagen abnormalities are prevented by lipolitic acid. *Exp Diabetes Res.* 2004; 5: 237-244.
136. Verani J, Perone P, Merfert MG, Moon SE, Larkin D, Stevens MJ. All-trans retinoic acid improves structure and function of diabetic rat skin in organ culture. *Diabetes* 2002; 51: 3510-3516.

137. Rajasekar P, Anuradha CV. L-carnitine inhibits protein glycation in vitro and in vivo: evidence for a role in diabetic management. *Acta Diabetol.* 2007; 44: 83-90.
138. Li G, Tang J, Du Y, Lee CA, Kern TS. Beneficial effects of a novel RAGE inhibitor on early diabetic retinopathy and tactile allodynia. *Mol Vis.* 2011; 17: 3156-3165.
139. Boor P, Celec P, Behuliak M i wsp. Regular moderate exercise reduces advanced glycation and ameliorates early diabetic nephropathy in obese Zucker rats. *Metabolism* 2009; 58(11): 1669-1677.

## SPIS TABEL I RYCIN

- Tabela 1.** Charakterystyka kliniczna grupy badanej.
- Tabela 2.** Charakterystyka kliniczna grupy badanej w zależności od obecności powikłań.
- Tabela 3.** Zależność pomiędzy AF a wybranymi parametrami.
- Tabela 4.** Charakterystyka kliniczna pacjentów z obecnością CChN oraz osób bez CChN.
- Tabela 5.** Charakterystyka kliniczna pacjentów z obecnością retinopatii oraz osób, u których nie doszło do zmian na dnie oka.
- Tabela 6.** Charakterystyka kliniczna pacjentów z obecnością neuropatii oraz osób bez wykładników uszkodzenia obwodowego układu nerwowego.
- Tabela 7.** Charakterystyka kliniczna pacjentów z obecnością jakiegokolwiek mikroangiopatii oraz osób, u których nie doszło do rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy.
- Tabela 8.** Model regresji logistycznej wieloczynnikowej dla mikroangiopatii cukrzycowej z uwzględnieniem zależności od płci męskiej, czasu trwania cukrzycy, palenia papierosów, nadciśnienia tętniczego, BMI, HbA1c, AF.
- Rycina 1.** AGE-Reader (DiagnOptics Technologies B.V., Holandia).
- Rycina 2.** Wykres zależności pomiędzy AF a wiekiem pacjentów.
- Rycina 3.** Wartości AF w zależności od stadium CChN. Test ANOVA rang Kruskala-Wallisa.
- Rycina 4.** Wskaźnik autofluorescencji skóry u osób z retinopatią proliferacyjną i z retinopatią nieproliferacyjną.