

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



**Biomarkery v diagnostice a terapii pozdních
komplikací diabetu**

*Biomarkers in the diagnosis and treatment of diabetic
complications*

MUDr. Jan Šoupal

2017

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: 3. interní klinika VFN a 1. LF UK v Praze

Školitel: doc. MUDr. Martin Prázný, CSc., Ph.D.

Obsah

1. Abstrakt	3
2. Abstract.....	4
3. Úvod.....	5
4. Hypotézy a cíle práce.....	7
4.1. Hypotézy.....	7
4.2. Cíle práce.....	7
5. Materiál a metodika.....	8
5.1. Výpočet glykemické variability.....	8
5.2. Přístroje pro kontinuální monitoraci a glukometry.....	9
5.3. Hodnocení přítomnosti mikrovaskulárních komplikací.....	10
6. Výsledky.....	11
7. Diskuse.....	15
8. Závěry.....	18
9. Použitá literatura.....	19
10. Seznam publikací autora.....	20

1. Abstrakt

Předmětem práce bylo studium biomarkerů v diagnostice a terapii pozdních komplikací diabetu (DM). Mezi tyto ukazatele je řazena také glykemická variabilita (GV), na kterou byla naše práce zaměřena především.

Zatím není jasné, zda může zvýšená GV přispívat ke vzniku mikrovaskulárních komplikací (MVK). Dosud publikované studie hodnotily GV především z výsledků rutinního selfmonitoringu prováděného glukometry (SMBG). V první části práce jsme proto porovnali GV vypočítanou ze záznamu z kontinuální monitorace glukózy (CGM) s přítomností MVK u pacientů s DM 1. typu. Ukázalo se, že GV vypočítaná z CGM, ale nikoliv z běžného SMBG, je signifikantně vyšší u pacientů s přítomnými MVK, přestože se tito pacienti nelišili v hladině glykovaného hemoglobinu (HbA_{1c}). Tento výsledek podporuje hypotézu, že vyšší GV může souviset s rozvojem komplikací a že HbA_{1c} dostatečně nepopisuje veškeré aspekty kompenzace DM. Navíc se ukázalo, že stanovení GV pomocí SMBG je nepřesné.

Pro hodnocení GV zatím není akceptována žádná standardní metoda. V naší studii nepřineslo stanovení komplexnějšího parametru (MAGE) více informací oproti jednodušším způsobům výpočtu (např. SD_T - celková směrodatná odchylka). SD_T lze navíc snadno použít v klinické praxi.

Naše práce dále přispěla k představení nového modelu pro výzkum GV na tkáňových kulturách. Model vychází z GV skutečných pacientů s DM a odráží tak lépe reálnou situaci. Zvýšená GV, v porovnání se setrvalou hyperglykemií, měla v této práci obdobný, nebo dokonce významnější vliv na expresi řady genů zapojených v patofyziologii komplikací DM.

Výsledky naší práce tedy naznačily, že by snížení GV mohlo být významné z hlediska rozvoje komplikací. Proto jsme se v další studii zaměřili na otázku, zda je možné zvýšenou GV u DM 1. typu snížit a jaké prostředky jsou v tomto ohledu nejúčinnější. Jako první jsme v dlouhodobé prospektivní studii ukázali, že GV (stanovená pomocí SD_T) a další parametry kompenzace DM lze v současné době nejefektivněji snížit dlouhodobým používáním CGM.

2. Abstract

The main objective of this study was research on biomarkers used in both diagnosis and therapy of diabetic complications. The main focus of our work came to be on one of these biomarkers - glycemic variability (GV).

So far it is unclear whether increased GV can contribute to the development of microvascular complications (MVC). Studies published so far have assessed GV primarily from routine self-monitoring of blood glucose (SMBG). In the light of this uncertainty, the first part of this work compares GV calculated from continuous glucose monitoring (CGM) with the presence of MVC in type 1 diabetic patients (T1D). GV calculated from CGM, but not from SMBG, was significantly higher in T1D patients with MVC, even though there was no significant difference in glycated hemoglobin (HbA_{1c}). This finding supports the hypothesis that higher GV is related to higher risk of MVC and that HbA_{1c} does not describe diabetes control completely. Moreover, it was shown that GV calculated from SMBG is insufficient.

There is still no fully accepted standard method of assessing GV. Our results suggest that the more complex parameters (e.g. mean amplitude of glycemic excursions - MAGE) provide no additional information over simple parameters (eg. total standard deviation - SD_T). Furthermore, SD_T can be easily used in clinical practice.

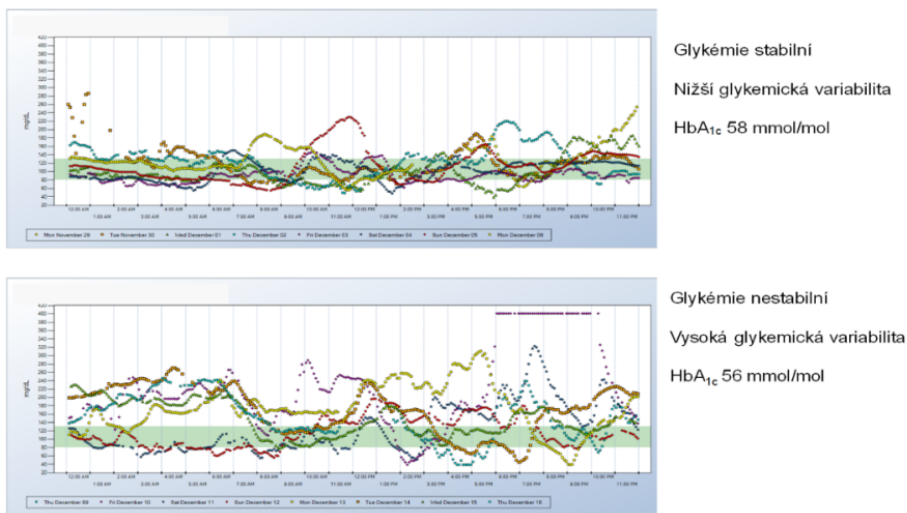
Our work has also contributed to the introduction of novel research into GV in cell cultures. The new model is based on GV profiles of actual patients and thus reflects better real T1D situations. In this study high GV had, in comparison with continuous hyperglycemia, increased or similar impact on the expression of various genes involved in the pathophysiology of MVC.

Our results suggest that decrease in GV could decrease the risk of MVC. However, the most effective tool for improving GV is unknown. Therefore, the next step was to compare four different treatment strategies for T1D based on different combinations of insulin delivery and monitoring systems. This further work showed that the most effective treatments are based on real-time CGM, irrespective of insulin delivery method.

3. Úvod

K posouzení rizika budoucího rozvoje pozdních diabetických komplikací slouží nejčastěji glykovaný hemoglobin (HbA_{1c}). Hladina HbA_{1c} ale nevyjadřuje riziko komplikací kompletně. Ve studii DCCT (Nathan DM et. al., 1993) provedené u pacientů s DM 1. typu se ukázalo, že ačkoliv intenzifikovaná inzulínová léčba snížila riziko rozvoje diabetické retinopatie o 73 % ve srovnání se standardní léčbou, vyšší hodnoty HbA_{1c} a délka trvání DM vysvětlily pouze 11 % rizika retinopatie. To znamená, že musí existovat ještě další faktory nezávislé na HbA_{1c} , které vysvětlí zbývajících 89 % (Lachin JM. et. al., 2008).

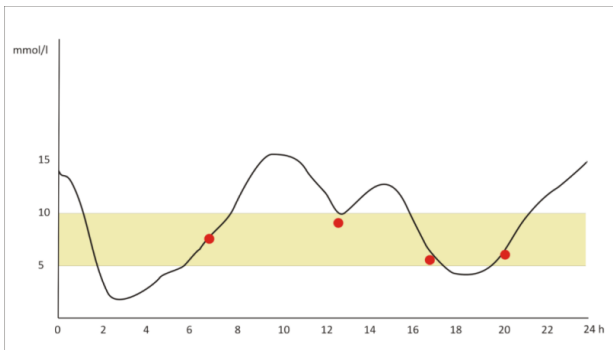
HbA_{1c} jako sumární parametr neinformuje zejména o krátkodobých změnách glykémie – tzv. glykemické variabilitě (GV) (obrázek 1).



Obrázek 1: Záznamy z kontinuální monitorace glukózy dokumentují rezervy hodnocení kompenzace DM pouze dle HbA_{1c} . První z pacientů má nízkou a druhý vysokou glykemickou variabilitu. HbA_{1c} je ale v obou případech podobný. Každá z barevných linií odpovídá jednomu dni monitorace.

HbA_{1c} je tedy do značné míry statický parametr, vypovídající o průměrné glykémii za posledních 6-8 týdnů. Proto jedním z cílů této práce bylo vedle HbA_{1c}, popsat také dynamickou složku kompenzace - GV.

Většina doposud provedených studií zabývající se možnou souvislostí GV s komplikacemi DM vycházela z výpočtu pomocí klasického selfmonitoringu glykemií (SMBG) prováděného několikrát denně. Výpočet GV z klasického glykemického profilu však může být nepřesný (Kovatchev B, Cobelli C, 2016), neboť k řadě „poklesů“ a „vzestupů“ glykémie dojde bez povšimnutí i mezi jednotlivými měřeními (obrázek 2). Přesněji lze vypočítat GV analýzou kontinuálního monitorování glukózy (CGM – Continuous Glucose Monitoring).



Obrázek 2: Schéma jednodenního záznamu CGM. Čtyři červené body označují glykémii zjištěnou glukometrem. Při SMBG není řada poklesů a vzestupů glykémie zaznamenána. Při CGM (černá čára) je možno získat v závislosti na typu senzoru bezmála 300 měření denně.

Náš výzkum se zabýval možnou souvislostí zvýšené GV s mikrovaskulárními komplikacemi DM, potenciálními patogenetickými mechanismy, kterými by mohla zvýšená GV přispívat k rozvoji komplikací a možnostmi jejího snížení.

Výsledky této práce byly publikovány v domácích i zahraničních časopisech s IF a byly prezentovány na významných českých, evropských i amerických konferencích zabývajících se problematikou diabetu.

4. Hypotéza a cíle práce

4.1. Hypotéza

„Zvýšená glykemická variabilita se uplatňuje v patofyziologii komplikací DM 1. typu. K prokázání této souvislosti je nutné její stanovení pomocí kontinuální monitorace glukózy.“

4.2. Cíle práce

Víme, že HbA_{1c} nevyjadřuje dostatečně komplexně riziko komplikací DM. Z vědecké hypotézy vyplývá, že dalším možným faktorem, který přispívá k rozvoji komplikací, by mohla být zvýšená GV. Proto základním cílem této dizertační práce bylo studium vztahu mikrovaskulárních komplikací DM 1. typu a krátkodobé GV.

GV může být vypočítána buď z běžného glykemického profilu získaného měřením pomocí glukometrů a/nebo z dat získaných pomocí kontinuální monitorace glukózy v podkoží. Měření glukometrem několikrát denně ale nedokáže postihnout všechny výkyvy glykémie. Navíc, většina doposud provedených studií zabývajících se touto problematikou, vycházela při výpočtu GV právě z klasické monitorace glukometrem. Z tohoto důvodu bylo dalším cílem zpřesnit výpočet GV pomocí kontinuální monitorace glukózy a ověřit, zda toto zpřesnění výpočtu povede k odhalení souvislostí mezi GV a komplikacemi DM.

K hodnocení GV je možno použít několik metod, ale prozatím není žádná akceptována jako univerzální. Proto dalším cílem byla snaha o určení této metody.

Při základním výzkumu GV na tkáňových kulturách je zvýšená GV a setrvalá hyperglykémie často simulována způsobem, který je odlišný od skutečných podmínek lidského organismu. Proto jedním z cílů bylo vytvořit klinicky relevantní *in vitro* experimentální model pro výzkum GV, který by co nejlépe odrazil reálnou GV pozorovanou u skutečných pacientů s DM 1. typu i zdravých jedinců a zkoumat, nakolik vysoká a nízká GV ovlivňuje expresi

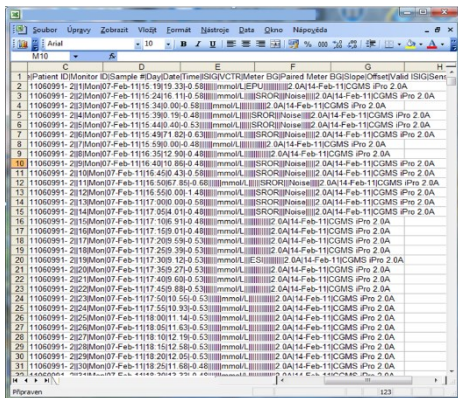
genů, jejichž produkty mohou hrát důležitou úlohu v patofyziologii komplikací DM.

Zvýšená GV je spojena se zvýšeným rizikem hypoglykémie, je překážkou k uspokojivé kompenzaci a možná se podílí na vzniku chronických komplikací DM. Z těchto důvodů je důležité pokusit se vysokou GV snížit. Proto dalším cílem této práce bylo ověřit, zda je možné GV snížit dlouhodobým používáním kontinuální monitorace v reálném čase a porovnat výsledky této léčby s jinými přístupy uplatňujícími se v léčbě DM 1. typu.

5. Materiál a metodika

5.1. Výpočet glykemické variability

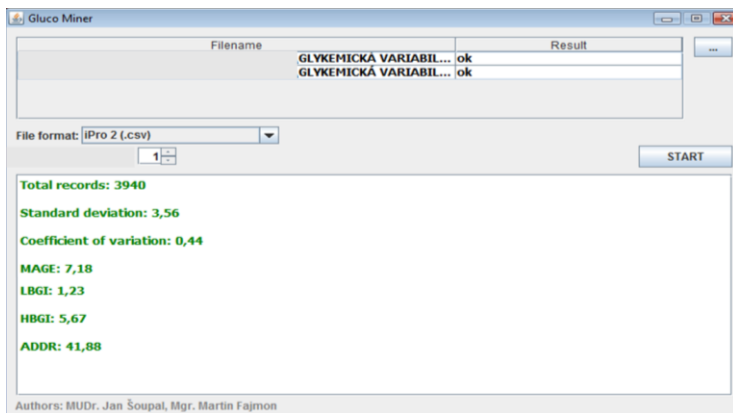
K hodnocení GV je možno použít několik metod, prozatím však není žádná akceptována jako univerzální (Kovatchev B, Cobelli C, 2016; Rodbard D., 2012). V naší práci byla použita celková směrodatná odchylka (SD_T), variační koeficient (CV) a parametr MAGE (Mean Amplitude of Glycemic Excursions). Parametry GV byly vypočítány z běžného selfmonitoringu glykemií prováděného glukometry a především z dat získaných pomocí CGM. Informace z CGM byly nejprve staženy do originálních programů výrobců pro kontinuální monitoraci, které slouží ke klinickému hodnocení. K výpočtu GV bylo nutné data dále exportovat (obrázek 3).



M10	C	D	E	F	G	H	
1	1pPatient ID	100991	2018Mon07	Feb-11	19:19	330.0	58
2	11060991	2118Mon07	Feb-11	19:19	330.0	58	
3	11060991	2120Mon07	Feb-11	24:16	111.0	58	
4	11060991	2120Mon07	Feb-11	15:34	00.0	58	
5	11060991	2124Mon07	Feb-11	15:38	15.0	48	
6	11060991	2128Mon07	Feb-11	15:44	40.0	53	
7	11060991	2128Mon07	Feb-11	15:49	12.0	53	
8	11060991	2171Mon07	Feb-11	15:59	00.0	48	
9	11060991	2128Mon07	Feb-11	16:35	12.5	0	
10	11060991	2128Mon07	Feb-11	16:49	88.0	48	
11	11060991	2118Mon07	Feb-11	16:45	0.3	0	
12	11060991	2118Mon07	Feb-11	16:56	45.0	60	
13	11060991	2112Mon07	Feb-11	16:55	0.8	1.48	
14	11060991	2113Mon07	Feb-11	17:00	0.0	0	
15	11060991	2114Mon07	Feb-11	17:04	0.1	0	
16	11060991	2115Mon07	Feb-11	17:10	9.1	0	
17	11060991	2116Mon07	Feb-11	17:15	10.0	0	
18	11060991	2117Mon07	Feb-11	17:20	0.3	0	
19	11060991	2118Mon07	Feb-11	17:26	3.0	0	
20	11060991	2119Mon07	Feb-11	17:30	13.0	0	
21	11060991	2120Mon07	Feb-11	17:35	27.0	0	
22	11060991	2121Mon07	Feb-11	17:40	6.0	0	
23	11060991	2122Mon07	Feb-11	17:45	6.0	0	
24	11060991	2123Mon07	Feb-11	17:50	10.0	0	
25	11060991	2123Mon07	Feb-11	17:55	10.0	0	
26	11060991	2125Mon07	Feb-11	18:00	11.0	0	
27	11060991	2127Mon07	Feb-11	18:05	11.0	0	
28	11060991	2127Mon07	Feb-11	18:12	18.0	0	
29	11060991	2128Mon07	Feb-11	18:12	18.0	0	
30	11060991	2128Mon07	Feb-11	18:20	12.0	0	
31	11060991	2130Mon07	Feb-11	18:25	11.0	0	

Obrázek 3: „Nativní“ soubor získaný exportem dat z originálního programu pro analýzu záznamů z kontinuální monitorace (Program CareLink iPro).

Exportem je získáno velké množství nesourodých dat, která jsou náročná na filtrování a také samotné vzorce GV jsou poměrně složité, proto byl vytvořen vlastní program, který umožňuje vypočítat zvolené parametry GV (obrázek 4).

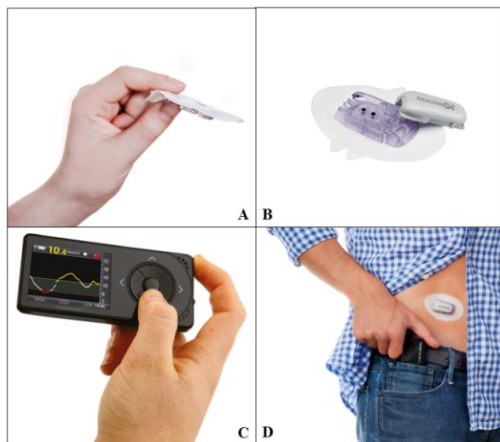


Obrázek 4: Vlastní software vyvinutý pro výpočet parametrů glykemické GV (GlucoMiner).

5.2. Přístroje pro kontinuální monitoraci a glukometry

Pacienti byli monitorováni pomocí různých přístrojů pro CGM, které byly používány v zaslepeném módu (profesionální kontinuální monitorace) i v otevřeném nastavení (monitorace v reálném čase). Pro profesionální CGM byl používán systém iPro2TM (Medtronic, Northridge, CA) a Dexcom 7 Plus (Dexcom, San Diego, CA). K monitoraci v reálném čase byl použit systém MiniMed Paradigm VeoTM se senzorem Enlite (Medtronic, Northridge, CA) a senzor Dexcom G4 (Dexcom, San Diego, CA) v kombinaci s inzulinovou pumpou Animas Vibe nebo samostatně. Příklad systému pro CGM v reálném čase je uvedený na obrázku 5.

Hodnota glykémie, nutná především pro výpočet GV z klasického selfmonitoringu a ke kalibraci systémů pro CGM, byla stanovena pomocí osobních glukometrů Accu-ChekTM (Roche, Basel, Switzerland) nebo One-TouchTM (LifeScan, Milpitas, CA).



Obrázek 5: Systém pro kontinuální monitoraci glukózy (Dexcom G4). A. Senzor; B. Senzor a vysílač; C. Přijímač; D. Celý systém pro kontinuální monitoraci po zavedení do podkoží.

5.3. Hodnocení přítomnosti mikrovaskulárních komplikací

Přítomnost diabetické retinopatie byla hodnocena oftalmologem pomocí nepřímé oftalmoskopie v arteficiální mydriáze. Mikroalbuminurie, použitá jako marker diabetické nefropatie, byla měřena jako poměr albumin/kreatinin (ACR) ve vzorku sbírané moči. Hodnoty ACR vyšší než 2,5 g/mol u mužů a 3,5 g/mol u žen byly hodnoceny jako pozitivní.

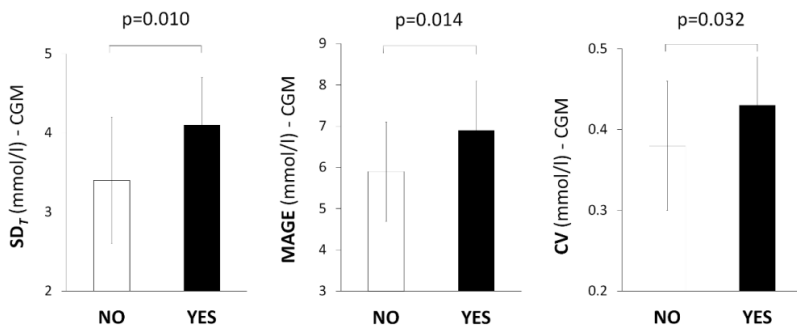
Přítomnost distální senzomotorické neuropatie byla hodnocena neinvazivně, určením prahu vibračního čítí (VPT - vibration perception threshold) bioteziometrem (Bio-Medical Instrument Co, Newbury, OH). Hodnoty VPT < 15 V jsou považovány za normální, od hodnot více jak 15 V hovoříme o porušeném prahu vibračního čítí a hodnoty přesahující 25 V jsou klasifikovány jako abnormální, značí přítomnost senzomotorické neuropatie.

Podrobný popis výběru pacientů, statistického zpracování a další metodologické podrobnosti jsou popsány v příložených publikacích.

6. Výsledky

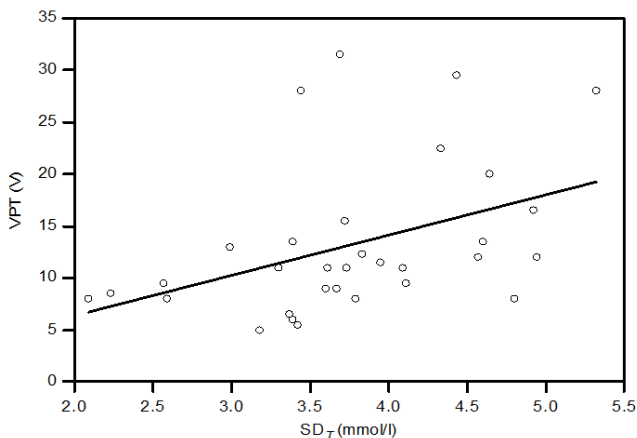
První část dizertační práce byla zaměřena na porovnání krátkodobé GV s přítomností mikrovaskulárních komplikací (MVK) u pacientů s DM 1. typu.

Pacienti s jakoukoliv MVK měli signifikantně vyšší GV vypočítanou z CGM, než pacienti bez komplikací (SD_7 : $4,1 \pm 0,6$ vs. $3,4 \pm 0,8$ mmol/l [$p=0,010$]; CV: $0,43 \pm 0,06$ vs. $0,38 \pm 0,08$ [$p=0,032$]; MAGE: $6,9 \pm 1,2$ vs. $5,9 \pm 1,2$ mmol/l [$p=0,014$]) (obrázek 6). Obě skupiny se přitom nelišily v hladině glykovaného hemoglobinu (HbA_{1c} : 70 ± 9 vs. 69 ± 10 mmol/mol, NS) a závislost GV a MVK byla signifikantní i po provedení multivariační analýzy (adjustace na HbA_{1c} , průměrnou glykémii, pohlaví a věk).



Obrázek 6. Glykemická variabilita u pacientů s mikrovaskulárními komplikacemi je vyšší. Bílé sloupce – žádné mikrovaskulární komplikace. Černé sloupce – mikrovaskulární komplikace.

Při bližším pohledu na jednotlivé komplikace byla GV vyšší u pacientů s retinopatií v porovnání s pacienty bez retinopatie ($n=14$, SD_7 : $4,1 \pm 0,7$ vs. $3,5 \pm 0,8$ mmol/l; $p=0,03$). Podobně tomu bylo u pacientů s mikroalbuminurií ($n=7$, SD_7 : $4,3 \pm 0,5$ vs. $3,6 \pm 0,8$ mmol/l; $p=0,04$) a s porušeným prahem vibračního čítí (VPT) na dolních končetinách ($n=8$, SD_7 : $4,3 \pm 0,5$ vs. $3,6 \pm 0,8$ mmol/l; $p=0,04$). U všech pacientů byla navíc prokázána pozitivní asociace mezi VPT a SD_7 ($r=0,51$; $p=0,0026$) (obrázek 7).



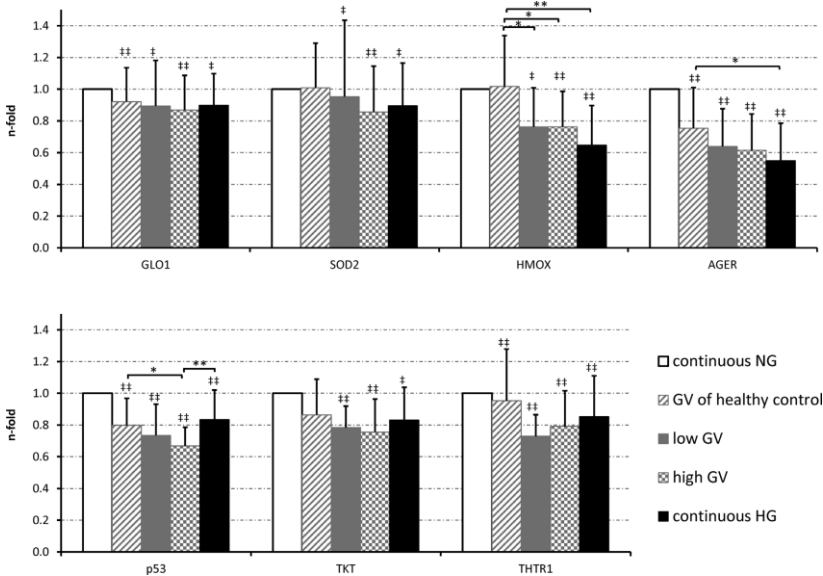
Obrázek 7: Pozitivní závislost mezi prahem vibračního čítí (VPT) a celkovou směrodatnou odchylkou (SD_T) ($r=0,51$; $p=0,0026$).

Naopak mezi oběma skupinami pacientů (s přítomnými a nepřítomnými MVK) nebyly prokázány signifikantní rozdíly v GV vypočítané z klasického selfmonitoringu prováděného pouze pomocí glukometrů.

V druhé části práce byl hodnocen vliv GV na expresi některých genů, jejichž produkty mohou hrát důležitou úlohu v patofyziologii komplikací diabetu. Tento výzkum probíhal ve spolupráci s týmem prof. Kateřiny Kaňkové z Ústavu patologické fyziologie LF Masarykovy univerzity. Naší úlohou bylo především vytvořit nový model výzkumu GV, který lépe odráží reálnou GV pozorovanou u skutečných pacientů s DM 1. typu.

Hodnoceny byly: glyoxaláza 1 (GLO1), transketoláza (TKT), transportér pro thiamin 1 (THTR1), hemoxygenáza (HMOX1), superoxidodismutáza 2 (SOD2), protein p53 (p53) a receptor pro produkty pokročilé glykace (RAGE). Expresie genů při setrvalé hyperglykémii a v podmínkách GV (nízká GV, vysoká GV a GV zdravých dobrovolníků) byla porovnávána s expresí při setrvalé normoglykémii. Hlavní výsledky jsou shrnuty na obrázku číslo 8. Ve studii se ukázalo, že GV ovlivňuje expresi

některých genů uplatňujících se v mechanismech glukotoxicity podobně (GLO1, SOD2, HMOX a RAGE) nebo i více (TKT, THTR1, p53) ve srovnání se setrvalou hyperglykemií.



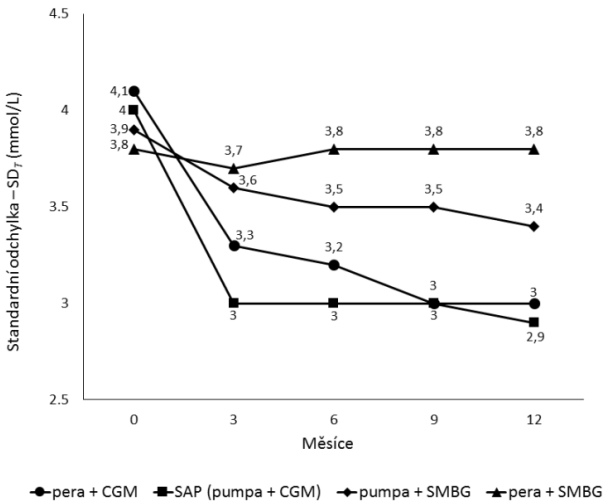
Obrazek 8: Porovnání vlivu glykemické variability (GV) setrvalé normoglykémie (NG) a setrvalé hyperglykémie (HG) na expresi genů zapojených v patofyziologii komplikací diabetu. GLO1 - glyoxaláza 1; SOD2 - superoxididmutáza 2; HMOX - hemoxygenáza; AGER - receptor pro produkty pokročilé glykace, TKT – transketoláza, THTR1 - transportér pro thiamin. # ($p < 0,05$); ## ($p < 0,01$); * ($p < 0,05$); ** $p < 0,01$).

Poslední část disertační práce se zabývala vlivem kontinuální monitorace glukózy v reálném čase (RT-CGM) na GV a ostatní parametry kompenzace diabetu 1. typu. V prospektivní studii trvající jeden rok byly porovnávány 4 léčebné modalitty.

- 1) Léčba pomocí inzulínových per (MDI) doplněná o klasický selfmonitoring glykémie pomocí glukometrů (SMBG).
- 2) Léčba pomocí inzulínové pumpy a SMBG.
- 3) Léčba pomocí MDI doplněná o RT-CGM.

4) Léčba pomocí pumpy a kontinuální monitorace (SAP - Sensor Augmented Pump).

Po roce sledování došlo k nejvýznamnějšímu snížení GV při použití RT-CGM (SD_T : $4,0 \pm 0,7$ vs. $3,0 \pm 0,5$; $p < 0,0001$). Obě podskupiny pacientů na SAP i MDI + RT-CGM vykazovaly srovnatelné zlepšení (obrázek 9). Ke snížení GV vedla také léčba inzulinovou pumpou bez kontinuální monitorace (SD_T : $3,9 \pm 0,6$ vs. $3,4 \pm 0,6$; $p < 0,01$), zatímco ve skupině pacientů pouze na perech a SMBG ke snížení GV nedošlo.



Obrázek 9: Porovnání léčebných strategií DM 1. typu: Vliv na glykemickou variabilitu, která je vyjádřena celkovou směrodatnou odchylkou (SD_T).

U pacientů s RT-CGM došlo také k významnému poklesu HbA_{1c} ($67,5 \pm 10,4$ vs. $54,5 \pm 9,1$ mmol/mol; $p < 0,0001$), přitom obě podskupiny pacientů na SAP i MDI + RT-CGM vykazovaly podobné zlepšení HbA_{1c} . Ke snížení HbA_{1c} vedla také samotná léčba pumpou bez RT-CGM ($68,3 \pm 9$ vs. $62,7 \pm 8$ mmol/mol; $p < 0,05$), naopak ve skupině na inzulinových perech a SMBG nebyl dosažen signifikantní pokles HbA_{1c} . K významnějšímu poklesu HbA_{1c} došlo u pacientů s RT-CGM ve srovnání s léčbou pumpou samotnou ($54,5 \pm 9,1$ vs. $62,7 \pm 8$ mmol/mol; $p = 0,0032$). Ke snížení času stráveného v hypoglykémii došlo pouze u pacientů na RT-CGM (8 ± 4 vs. $6 \pm 3\%$; $p < 0,01$).

7. Diskuze

Naše práce se zabývala novými biomarkery v diagnostice a terapii pozdních komplikací diabetu. Mezi tyto ukazatele je řazená také GV, na kterou se tato dizertační práce soustředila především. Za pomoci CGM jsme totiž v současné době schopni GV spolehlivě popsat, vypočítat, ale také snížit.

Ačkoliv u DM 2. typu přibývají v posledních letech důkazy o možné souvislosti mezi zvýšenou GV a mikro- i makrovaskulárními komplikacemi (Nalysnyk L. et al., 2010), podobné výsledky nebyly konzistentně pozorovány u DM 1. typu. Tento závěr je poměrně překvapivý, protože pacienti s DM 1. typu tvoří v porovnání s pacienty s DM 2. typu homogennější skupinu. Homogenitu zkoumané skupiny pacientů považujeme za velice důležitou, proto jsme se při výzkumu GV rozhodli soustředit právě na pacienty s DM 1. typu. Tito pacienti navíc obvykle netrpí v tak významné míře ostatními metabolickými chorobami, které jsou naopak velmi typické pro pacienty s DM 2. typu. Tento faktor mohl přispět ke zvýšení šance na prokázání případné souvislosti mezi mikrovaskulárními komplikacemi diabetu a GV.

V naší práci byla GV vypočítaná ze záznamu CGM signifikantně vyšší u pacientů s DM 1. typu a přítomnými mikrovaskulárními komplikacemi, přestože tito pacienti měli podobné hodnoty HbA_{1c} jako pacienti bez komplikací. Tento výsledek podporuje ověřovanou hypotézu, že vyšší GV může u DM 1. typu souviset s rozvojem mikrovaskulárních komplikací a že HbA_{1c} dostatečně nepopisuje veškeré aspekty kompenzace diabetu.

Retrospektivní analýzy studie DCCT a jejího pokračování, studie EDIC, neprokázaly na rozdíl od naší práce signifikantní korelaci mezi GV a retinopatií, neuropatií nebo nefropatií (Siegelar SE. et al., 2010). Z hlediska současného přístupu k analýze GV měla však studie DCCT/EDIC významné limitace. Tato studie nebyla nikdy primárně připravována na hodnocení GV, ale na porovnání intenzifikované a konvenční inzulínové léčby. Nejdůležitější limitací byl způsob výpočtu GV. Autoři k němu použili pouze 5-7 bodový profil glykemií, který byl měřen jen jednou za 3 měsíce. Výpočet GV z klasického glykemického profilu může být ale nepřesný (Siegelar SE. et al.,

2010), neboť k řadě poklesů a vzestupů glykémie dojde bez povšimnutí mezi měřeními glukometrem. Tomu napovídají i výsledky naší studie, ve které 4 bodový glykemický profil nedokázal odhalit souvislost GV s komplikacemi, ačkoliv GV vypočítaná ze záznamů CGM jasně tuto spojitost prokázala. Tento nálezn je opět v souladu s ověřovanou hypotézou. Je důležité zdůraznit, že ačkoliv se řada studií zabývala problematikou GV, překvapivě málo pozornosti bylo věnováno zdrojovým datům, ze kterých byla GV vypočítávána. Počet měření se pohyboval v širokém rozpětí od 5-7 měření glykémie každé 3 měsíce ve studii DCCT (Siegelaa SE. et al., 2009) přes 70 měření glykémie v průběhu 4 týdnů (Bragd J. et al., 2008) až k měření v 5 minutových intervalech pomocí CGM (Monnier L. et al., 2006). Studie zabývající se minimální frekvencí měření, ze kterých může být ještě GV spolehlivě vypočítávána, ukázala, že výpočet GV pomocí SD_T se stává nespolehlivý, pokud jsou jednotlivá měření od sebe vzdálená více jak 2-4 hodiny a že hodnota MAGE je nepřesná, pokud jsou jednotlivá měření vzdálená více než 1 hodinu (Baghurst PA. et al., 2010). Proto se domníváme, že by měla být CGM pro výpočet GV jednoznačně preferována.

K určení GV je možné využít celou řadu různě složitých výpočtů. Jedním z cílů této dizertační práce bylo určení vhodné metody k výpočtu GV. Výsledky naší práce ale ukazují, že jednotlivé parametry GV mezi sebou významně korelují a že komplexnější parametry nepřinášejí více informací, než poskytuje poměrně jednoduchý výpočet SD_T nebo CV. Na základě těchto výsledků se nedá definitivně uzavřít, že SD_T nebo CV jsou nejvhodnější parametry k výpočtu GV, ale s ohledem na jejich jednoduchý výpočet je lze bez větších překážek použít v rutinní péči o pacienty s diabetem i v experimentu.

Naše studie porovnávající GV u pacientů s komplikacemi a bez přítomných mikrovaskulárních komplikací nebyla prospektivní. V tom lze spatřovat její hlavní limitaci. Pouze velká mezinárodní prospektivní studie by dokázala definitivně odpovědět na otázku, zda GV zvyšuje riziko komplikací diabetu či nikoliv. Na druhou stranu, taková studie by vyžadovala zahrnout tisíce pacientů s krátkým trváním diabetu, kteří ještě nemohli rozvinout specifické komplikace. Pacienti by museli být sledováni mnoho let (Gubitosi-

Klug RA., 2014). GV by musela být měřena po většinu času pomocí zaslepené CGM, protože SMBG nedokáže postihnout GV dostatečně komplexně. Je pravděpodobné, že se zlepšujícími se terapeutickými možnostmi by se v průběhu let GV pacientů zařazených v takové studii snižovala. Nutnost dlouhodobého používání zaslepené CGM by takovou studii činila velice nákladnou a pacientům by zhoršovala kvalitu života, protože by museli používat zařízení, z něhož by neměli bezprostřední benefit. Z těchto důvodů se patrně i v budoucnu budeme muset spoléhat na nepřímé důkazy z menších klinických a patofyziologických studií provedených například *in vitro* na buněčných kulturách.

Studie, které se doposud zabývaly vlivem GV na tkáňové kultury, většinou ukazují na významnější poškození buněk, které jsou vystavené zvýšené GV (Quagliaro L. et al., 2003, Piconi L. et al., 2006). Metodika použitá k výzkumu GV *in vitro* se však v jednotlivých studiích výrazně lišila a především nedostatečně odrážela stav *in vivo*. Proto jedním z dalších cílů práce bylo vytvořit a otestovat nový model pro výzkum GV *in vitro*, který lépe odráží reálnou GV pozorovanou u skutečných pacientů. Poprvé byly k takovému výzkumu na tkáňových kulturách použity glykemické profily vytvořené podle záznamů CGM pacientů s DM 1. typu a zdravých dobrovolníků. Výsledky ukazují, že zvýšená GV odpovídající GV skutečných pacientů s DM 1. typu může mít v porovnání se setrvalou hyperglykemií podobný nebo dokonce významnější vliv na expresi některých genů, které hrají důležitou úlohu v patofyziologii komplikací diabetu.

Zvýšená GV je spojena se zvýšeným výskytem hypoglykemií a je pravděpodobné, že se podílí i na rozvoji pozdních komplikací diabetu. Navíc negativně ovlivňuje kvalitu života a psychickou pohodu pacienta a představuje významnou bariéru při snaze zlepšit kompenzaci diabetu. Z těchto důvodů je v klinické praxi důležité pokusit se GV u pacientů s diabetem snížit. Je prokázáno, že zvýšená GV může být u pacientů s DM 1. typu snížena použitím dlouhodobě působících inzulínových analog (White NH. et al., 2009), inzulínové pumpy (Pickup JC. et al., 2006, Bruttomesso D. et al., 2008) a pravděpodobně také používáním CGM v reálném čase (El-Laboudi AH. et al., 2016). Není ovšem jasné, který z těchto postupů je z hlediska snížení GV

nejefektivnější, protože tyto přístupy nebyly současně porovnávány ve stejné prospektivní studii.

Proto dalším cílem této práce bylo porovnat vliv RT-CGM na parametry kompenzace diabetu, včetně GV, u pacientů s DM 1. typu léčených inzulinovou pumpou nebo inzulinovými perami ve srovnání s režimy založenými na klasickém SMBG. Naše studie ukázala, že dlouhodobé používání RT-CGM vede k významnému snížení GV, HbA_{1c} a času stráveného v hypoglykémii. Obě podskupiny pacientů používající RT-CGM (pacienti na pumpě i pacienti na perách) vykazovaly srovnatelné zlepšení. Důležité je, že snížení GV i ostatních sledovaných parametrů u pacientů s RT-CGM bylo významnější než při použití samotné inzulinové pumpy nebo inzulinových per. Naše studie byla první prospektivní studií s délkou trvání jeden rok, která u pacientů s DM 1. typu současně porovnávala čtyři strategie léčby založené na rozdílné kombinaci podávání inzulinu a monitorace glykémie. Ukázalo se, že CGM v reálném čase je neúčinnějším nástrojem pro snížení GV a že k jejímu zlepšení dojde bez ohledu na to, jestli pacienti používají aplikaci inzulinu inzulinovou pumpou nebo inzulinová pera. Rozhodující tedy není ve většině případů způsob podávání inzulinu, ale používání CGM.

8. Závěr

Jedním z důležitých biomarkerů, který může souviset s komplikacemi diabetu je zvýšená GV. Výsledky naší práce ukázaly, že GV vypočítaná z kontinuální monitorace, ale nikoliv z dat získaných glukometry, je signifikantně vyšší u pacientů s přítomnými mikrovaskulárními komplikacemi, přestože se tyto pacienti neliší v koncentraci HbA_{1c} ani v průměrné glykémii zjištěné pomocí CGM. Tento výsledek podporuje hypotézu, že vyšší GV u DM 1. typu může souviset s rozvojem komplikací a že HbA_{1c} dostatečně nepopisuje veškeré aspekty kompenzace diabetu. Navíc se ukázalo, že stanovení GV pomocí SMBG je nepřesné. Proto je k výsledkům studií, které počítají GV z běžných profilů glykémie, nutno přistupovat obezřetně a

k dalšímu výzkumu je nezbytné používat data získaná pomocí kontinuální monitorací glykémie.

Pro hodnocení GV zatím není akceptována žádná standardní metoda. V naší studii stanovení komplexnějších parametrů nepřineslo více informací oproti jednodušším způsobům výpočtu, mezi které patří určení GV pomocí celkové směrodatné odchylky (SD_T) nebo variačního koeficientu. S ohledem na jednoduchý výpočet SD_T , který v současné době provádějí automaticky všechny programy pro analýzu záznamů z CGM, ji lze snadno použít v klinické praxi.

V neposlední řadě výsledky této dizertační práce přispěly k vytvoření nového modelu pro výzkum GV *in vitro*. Nový model vychází z GV skutečných pacientů a odráží tak lépe reálnou situaci, kterou lze očekávat u pacientů s DM 1. typu.

Jako první jsme v dlouhodobé prospektivní studii ukázali, že GV a další parametry kompenzace diabetu lze v současné době nejefektivněji snížit použitím dlouhodobé kontinuální monitorace glykémie.

Při jednáních se zdravotními pojišťovny přispěly v roce 2016 výsledky našeho výzkumu k úhradě CGM z prostředků veřejného zdravotního pojištění pro pacienty s DM 1. typu mimo jiné i v indikaci pro zvýšenou glykemickou variabilitu.

9. Použitá literatura

1. **Baghurst PA, Rodbard D, Cameron FJ.** The minimum frequency of glucose measurements from which glycaemic variation can be consistently assessed. *J Diabetes Sci Technol* 2010;4:1382–1385.
2. **Bragd J, Adamson U, Backlund LB, Lins PE, Moberg E, Oskarsson P.** Can glycaemic variability, as calculated from blood glucose self-monitoring, predict the development of complications in type 1 diabetes over a decade? *Diabetes Metab* 2008; 34:612–616.
3. **Bruttomesso D, Crazzolara D, Maran A, Costa S, Dal Pos M, Girelli A, Lepore G, Aragona M, Iori E, Valentini U, Del Prato S, Tiengo A, Buhr A, Trevisan R, Baritussio A.** In type 1 diabetic patients with good glycaemic control, blood glucose variability is lower during continuous subcutaneous insulin

- infusion than during multiple daily injections with insulin glargine. *Diabet Med* 2008; 25:326-332.
4. **El-Laboudi AH, Godsland IF, Johnston DG, Oliver NS.** Measures of Glycemic Variability in Type 1 Diabetes and the Effect of Real-Time Continuous Glucose Monitoring. *Diabetes Technol Ther.* 2016 Dec;18(12):806-812.
 5. **Gubitosi-Klug RA;** DCCT/EDIC Research Group. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: summary and future directions. *Diabetes Care.* 2014;37(1):44-9.
 6. **Kovatchev B, Cobelli C.** Glucose Variability: Timing, Risk Analysis, and Relationship to Hypoglycemia in Diabetes. *Diabetes Care.* 2016 Apr;39(4):502-10.
 7. **Lachin JM, Genuth S, Nathan DM, Zinman B, Rutledge BN,** for the DCCT/EDIC Research Group. Effect of glycemic exposure on the risk of microvascular complications in the Diabetes Control and Complications Trial—Revisited. *Diabetes* 2008; 57:995-1001.
 8. **Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol JP, Colette C.** Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 2006; 295:1681-1687.
 9. **Nalysnyk L, Hernandez-Medina M, Krishnarajah G.** Glycaemic variability and complications in patients with diabetes mellitus: evidence from a systematic review of the literature. *Diabetes Obes Metab* 2010;12:288–298.
 10. **Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, Davis M, Rand L, Siebert C.** Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993 Sep 30;329(14):977-86.
 11. **Pickup JC, Kidd J, Burmiston S, Yemane N.** Determinants of glycaemic control in type 1 diabetes during intensified therapy with multiple daily insulin injections or continuous subcutaneous insulin infusion: importance of blood glucose variability. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22:232-23.
 12. **Piconi L, Quagliaro L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zuodar G, Ceriello A.** Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes Metab Res Rev.* 2006 May-Jun;22(3):198-203.
 13. **Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Martinelli L, Motz E, Ceriello A.** Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells: the role of protein kinase C and NAD(P)H-oxidase activation. *Diabetes.* 2003 Nov;52(11):2795-804.
 14. **Rodbard D.** The challenges of measuring glycemic variability. *J Diabetes Sci Technol.* 2012 May 1;6(3):712-5.
 15. **Siegelaar SE, Frits Holleman, Joost B. L. Hoekstra, J. Hans De Vries.** Glucose Variability; Does it matter? *Endocrine Reviews* 2010; 31:171-182.

16. **Siegelaar SE, Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkin SL, Hoekstra JB, Devries JH.** Glucose variability does not contribute to the development of peripheral and autonomic neuropathy in type 1 diabetes: data from the DCCT. *Diabetologia* 2009; 52:2229-2232.
17. **White NH, Chase HP, Arslanian S, Tamborlane WV.** A comparison of glycemic variability associated with insulin glargine and intermediate-acting insulin when used as the basal component of multiple daily injections for adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32:387-393.

Seznam publikací autora

Publikace s IF, které jsou podkladem disertační práce:

Šoupal J, Škrha J Jr, Fajmon M, Horová E, Mráz M, Škrha J, Prázný M. Glycemic variability is higher in type 1 diabetes patients with microvascular complications irrespective of glycemic control. *Diabetes Technol Ther.* 2014 Apr;16(4):198-203.

IF 2,198

Šoupal J, Petruželková L, Flekač M, Pelcl T, Matoulek M, Daňková M, Škrha J, Svačina Š, Prázný M. Comparison of different treatment modalities for Type 1 diabetes Including Sensor-Augmented Insulin Regimens in 52-weeks follow-up: a COMISAIR study. *Diabetes Technol Ther.* 2016.

IF 2,198

Kuricová K, Pácal L, Šoupal J, Prázný M, Kaňková K. Effect of glucose variability on pathways associated with glucotoxicity in diabetes: Evaluation of a novel in vitro experimental approach. *Diabetes Res Clin Pract.* 2016 Apr;114:1-8.

IF 3,045

Škrha J, Šoupal J, Škrha J Jr, Prázný M. Glucose variability, HbA_{1c} and microvascular complications. *Rev Endocr Metab Disord.* 2016 Mar;17(1):103-10.

IF 5,088

Škrha J Jr, Šoupal J, Loni Ekali G, Prázný M, Kalousová M, Kvasnička J, Landová L, Zima T, Škrha J. Skin autofluorescence relates to soluble receptor for advanced glycation end-products and albuminuria in diabetes mellitus. *J Diabetes Res.* 2013;2013:650694.

IF 1,89

Horová E, Mazoch J, Hiigertová J, Kvasnička J, Skrha J, Soupal J, Prázný M. Acute hyperglycemia does not impair microvascular reactivity and endothelial function during hyperinsulinemic isoglycemic and hyperglycemic clamp in type 1 diabetic patients. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:851487. **IF 1,528**

Publikace bez IF, které jsou podkladem disertační práce:

Šoupal J, Prázný M. Glykemická variabilita. *DMEV.* 2012;162-169.

Šoupal J, Prázný M. Kontinuální monitorace glykemie jako nástroj pro odhalení nočních hypoglykemií. *Kazuistiky v diabetologii* 11, 4: 28–30, 2013.

Šoupal J. Snížení výskytu závažných hypoglykemií při kontinuální monitoraci glykemie v reálném čase. *Kazuistiky v diabetologii* 11, 4: 34–36, 2013.

Prázný M, Šoupal J. Glykemická variabilita and kontinuální monitorace glykémie. *Vnitr Lek.* 2014 Sep;60(9):757-63.

Šoupal J. Kontinuální monitorace glukózy u pacientů s režimem bazál-bolus. *Acta medicae* 2/2016.

Prázný M, Škrha J, Šoupal J, Škrha J. jr.: Krátkodobá a dlouhodobá glykemická variabilita a její vztah k mikrovaskulárním komplikacím diabetu. *Vnitr Lek.* 2016 Fall;62(Suppl 4):85-93.

Publikace s IF, které nejsou podkladem disertační práce:

Petruželková L, Picková K, Šumník Z, Šoupal J, Obermannová B. Effectiveness of SmartGuard technology in the prevention of nocturnal hypoglycemia after prolonged physical activity. 4/2017 akceptováno k publikaci v *Diabetes Technol Ther.*

IF 2,198

Rychlíková J, Vecka M, Jáchymová M, Macášek J, Hrabák P, Zeman M, Vávrová L, Šoupal J, Krechler T, Žák A. Osteopontin as a discriminating marker for pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Cancer Biomark.* 2016 Jun 7;17(1):55-65.

IF 1,736

Publikace bez IF, které nejsou podkladem disertační práce:

Šoupal J, Svačina Š. Komplexní účinek gliflozinů na kardiovaskulární systém u pacientů s diabetem. Postgraduální medicína 2016, ročník 18, č. 1

Šoupal J, Prázný M. Postavení nových antidiabetik v klinické praxi: SGLT-2 versus DPP-4 inhibitory. Vnitř Lék 2015; 61(4): 291-294.

Šoupal J. Individualizace léčby diabetu 2. typu: GLP-1 agonisté. Kazuistiky v diabetologii 13, 3: 23–26, 2015

Šoupal J, Prázný M. Kontrola glykémie u pacientů s akutním infarktem myokardu. Interv Akut Kardiol 2011; 10(2);67-71.

Škrha J Jr, Šoupal J, Prázný M, Škrha J. Glycation of lens proteins in diabetes and its non-invasive assessment - first experience in the Czech Republic. Vnitř Lék. 2015 Apr;61(4):346-50.

Flekač M, Šoupal J. Clinical efficacy and safety of basal insulin analogue glargine in patients with type 2 diabetes mellitus. Vnitř Lék. 2016 Fall;62(9):705-711.

Svobodová Š, Šoupal J, Svačina Š. Přínos kontinuální monitorace glykémie u pacientky s diabetem 2. typu. Kazuistiky v diabetologii 14, 4: 13–16, 2016.

Prázný M, Šoupal J, Horová E. Novinky v prevenci a léčbě diabetes mellitus 1. typu: biologická léčba u diabetu 1. typu a nové trendy ve vývoji inzulinových pump. Postgraduální medicína 3/2012.