

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát dizertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

**Patobiochemie diabetes mellitus a jeho komplikací  
– oxidační stres, mikrozánět a genetická predispozice**

**MUDr. Jan Škrha jr.**

2017

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF  
UK v Praze

Školitel: Prof. MUDr. Marta Kalousová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Marie Jáchymová, Ph.D.

# Obsah

1	Abstrakt .....	4
2	Abstract.....	5
3	Úvod .....	6
4	Hypotézy a cíle práce .....	6
5	Materiál a metodika .....	8
	5.1.1 Biochemické metody .....	8
	5.1.2 Molekulárně-genetické metody .....	9
	5.1.3 Fyzikální metody .....	9
6	Výsledky .....	10
	6.1 Studie 1: RAGE a RAGE ligandy .....	10
	6.2 Studie 2: Polymorfizmy FN3K a GLO1 .....	11
	6.3 Studie 3: Kožní autofluorescence .....	12
7	Diskuse.....	15
8	Závěry .....	19
9	Použitá literatura .....	21
10	Seznam publikací autora .....	24
	10.1 Publikace s IF, které jsou podkladem dizertační práce.....	24
	10.2 Publikace s IF, které nejsou podkladem dizertační práce.....	24
	10.3 Publikace bez IF, které nejsou podkladem dizertační práce.....	25

# 1 Abstrakt

Diabetes mellitus je chronické onemocnění s vysokou populační prevalencí a významnou morbiditou. Hlavní komplikace diabetu souvisí s chronickými změnami jak v malých, tak velkých cévách. Cílem dizertační práce bylo popsat některé nové časné biomarkery těchto změn, které by pomohly identifikovat včas rizikové pacienty. Zároveň byly studovány polymorfizmy vybraných genů zapojených do protektivních drah glukózového metabolismu.

Ve třech humánních studiích s diabetiky 1. a 2. typu byly analyzovány jednak speciální biochemické parametry související s receptorem pro konečné produkty pokročilé glykace (RAGE), dále polymorfizmy deglykačních enzymů glyoxalázy 1 (GLO1) a fruktosamin 3-kinázy (FN3K), a konečně stanovena intenzita glykace podkoží měřením kožní autofluorescence (SAF).

U diabetiků bylo pozorováno zvýšení solubilního RAGE i RAGE ligandů HMGB1 a EN-RAGE, resp. markerů endotelové dysfunkce oproti kontrolám. Jako první byla ukázána významná souvislost mezi polymorfizmy deglykačního enzymu FN3K (rs1056534) a (rs3848403) a koncentrací sRAGE, a dále významné rozdíly v markerech endotelové dysfunkce mezi osobami s různými genotypy polymorfizmu GLO1 (rs4746). Osoby s diabetem měly významně vyšší kožní autofluorescenci odrážející glykační zátěž. Navíc SAF byla signifikantně zvýšená u osob s endotelovou dysfunkcí, popř. s pozitivní albuminurií. Jako dlouhodobý marker glykace však SAF neměla těsnou souvislost s klasickým markerem střednědobé glykace glykovaným hemoglobinem.

Výsledky práce dokládají heterogenní biochemické změny, jež se uplatňují v rozvoji diabetické angiopatie. Úloha detailně studovaného sRAGE není zcela zřejmá – předpokládaná protektivní role je však dle posledních poznatků spíše minimální. Polymorfizmy genů deglykačních enzymů mají vliv na rozvoj cévních změn, ale k vytipování rizikových pacientů zatím nestačí. Naopak kožní autofluorescence může v klinickém použití pomoci vybrat pacienty s výraznější glykační zátěží a u nich poté intenzivněji léčit jejich hyperglykémii.

## 2 Abstract

Diabetes is a chronic disease with high prevalence and significant morbidity. Chronic changes in the wall of small and large vessels lead to main diabetes complications. Apart from long-term hyperglycemia, several factors are involved in the development of diabetes vasculopathy. The aim of this work was to describe new early biomarkers of these vascular changes, to identify risky patients. Alongside, gene polymorphisms involved in protective pathways of glucose metabolism were studied.

In three human studies with Type 1 (T1D) and Type 2 (T2D) diabetes patients special biochemical parameters of receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and its ligands, deglycation enzyme glyoxalase 1 (GLO1) and fructosamine 3-kinase (FN3K) gene polymorphisms were analyzed. Non-invasive measurement of glycation by skin autofluorescence (SAF) was assessed in all subjects.

Soluble RAGE, HMGB1 and endothelial dysfunction markers were increased in patients with diabetes as compared with controls, however the differences between T1D and T2D were not significant. For the first time, an association between FN3K (rs1056534) and (rs3848403) polymorphism and sRAGE concentration in diabetes was shown. GLO1 (rs4746) polymorphism was associated with changes in endothelial dysfunction. Patients with diabetes had higher skin autofluorescence reflecting increased glycation. Moreover, SAF was even higher if chronic vascular changes were present. Interestingly, SAF did not correlate enough with glycated hemoglobin, a common medium-term marker of glycation.

These results suggest heterogenous biochemical processes involved in the development of diabetic angiopathy. The role of sRAGE is still unclear – its previously suggested protective role seems unlikely. There could be some role of deglycation enzyme polymorphisms in the development of angiopathy, however it is not strong enough for prediction. On the contrary, skin autofluorescence seems to be a relevant tool for clinical purposes in risk prediction and early intensification of diabetes treatment.

### 3 Úvod

Diabetes mellitus je celosvětově rozšířené onemocnění, jehož incidence i prevalence neustále stoupá. Zatímco v roce 1995 bylo na světě asi 135 miliónů diabetiků (King H. et al., 1998), v roce 2015 již toto číslo dle Mezinárodní diabetologické federace (IDF, International Diabetes Federation) stoupl na 415 miliónů. Pokud bude nárůst prevalence pokračovat předpokládaným tempem, je odhadováno, že v roce 2040 bude na světě 642 miliónů diabetiků (IDF, 2015). Také v České republice pokračuje trend rostoucí prevalence diabetu, která překonala hranici 8 % populace. Navíc minimálně další 2 % tvoří osoby s doposud nediodagnostikovaným onemocněním.

Podobně narůstá i četnost některých diabetických cévních komplikací (Zvolský M., 2013). Právě chronické komplikace jsou hlavní příčinou vyšší morbidity a mortality diabetu. Bylo prokázáno, že skoro polovina všech úmrtí souvisejících s diabetem nastala u pacientů před šedesátým rokem věku (IDF, 2011). Rozvíjejí se dlouhodobě v řádu roků, často však již před samotnou manifestací diabetu. Proto se s nimi někdy setkáváme již v době diagnózy. Zároveň to jsou komplikace, které lze úspěšnou léčbou diabetu výrazně oddálit či zpomalit, ale rozvinuté komplikace již obvykle nelze zcela eliminovat. Přitom právě chronické komplikace diabetu jsou tím faktorem, který nejvíce ovlivňuje kvalitu života pacientů s diabetem (Quah J. H. et al., 2011).

### 4 Hypotézy a cíle práce

Patobiochemické změny u pacientů s diabetem jsou komplexní a zdaleka nesouvisí jen s izolovaně zvýšenou glykemií. Na rozvoji komplikací se podílejí další procesy, mj. alterovaný metabolismus sacharidů a lipidů či chronický vliv oxidačního stresu a rozvíjející se endotelové dysfunkce. Intenzita rozvoje těchto škodlivých změn pak závisí na genetické predispozici jedince, epigenetických změnách i environmentálních faktorech.

**Hypotéza:** Domníváme se, že na rozvoji chronických cévních změn u osob s diabetem se podílí jak změny genetické, které mohou ovlivnit schopnost jedince vyrovnat se s dlouhodobou vyšší glykemickou náloží, tak celkový stav glykace a oxidačního stresu, tedy faktory akcelerující endotelovou dysfunkci stojící na počátku angiopatického poškození.

Cílem studia proto bylo posouzení významnosti některých časnějších biologických markerů cévního postižení u pacientů s diabetem 1. a 2. typu a jejich souvislost s případnými mikroangiopatickými změnami. Zároveň byly studovány vytipované polymorfizmy genů ochranných deglykačních enzymů. Konečně byla otestována nová neinvazivní metoda stanovujících míru glykačního postižení tkání a její možné využití v predikci chronických komplikací.

Konkrétními cíli práce bylo:

- 1) stanovit, zda jsou rozdíly v koncentracích markerů endotelové dysfunkce a ligandů receptoru RAGE mezi osobami s diabetem 1. a 2. typu a zdravými kontrolami
- 2) stanovit, zda se liší koncentrace solubilního RAGE (sRAGE) mezi osobami s diabetem 1. a 2. typu a zdravými kontrolami, resp. zda je rozdíl v koncentraci sRAGE u diabetiků již s vyjádřenými mikroangiopatickými komplikacemi
- 3) stanovit u osob s diabetem 1. a 2. typu genotypové frekvence vytipovaných polymorfizmů genů uplatňujících se v deglykačních procesech /*FN3K* (rs1056534), *FN3K* (rs3848403) a *GLO1* (rs4746)/, resp. posoudit, zda jsou u osob s komplikacemi častější některé z těchto polymorfizmů
- 4) určit, zda souvisí v populaci diabetiků výše uvedené polymorfizmy s markery endotelové dysfunkce/aktivace, resp. s sRAGE
- 5) vyhodnotit parametr kožní autofluorescence u osob s diabetem a posoudit, zda odráží dlouhodobou kompenzaci diabetu, resp. souvisí s rizikem rozvoje cévních změn
- 6) stanovit faktory, které mohou ovlivnit kožní autofluorescenci

## 5 Materiál a metodika

### 5.1.1 Biochemické metody

Vzorky žilní krve byly odebírány u vyšetřovaných osob ráno nalačno do zkumavek bez antikoagulancií (pro získání séra) a zkumavek s EDTA (pro získání plazmy). Následně byly zkumavky s krevními vzorky centrifugovány 10 minut při 3000 rpm. Rutinní biochemické analyty byly stanovovány z čerstvě odebraných vzorků, zatímco pro speciální analýzy byly vzorky do doby měření uchovány v hlubokomrazícím boxu při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Sérové koncentrace solubilního RAGE (sRAGE) (Quantikine, RD Systems, Minneapolis, MN, USA), EN-RAGE (Abnova, Taipei City, Taiwan) a HMGB1 (IBL, Hamburg, Německo) byly stanoveny dle protokolu výrobce ELISA metodou.

Endotelová dysfunkce byla hodnocena všeobecně uznávanými markery (Haim M. et al., 2002, Widlansky M. E. et al., 2003). Pro stanovení sérových koncentrací jednotlivých analytů byly použity ELISA kity Human sP-selectin/CD62P, Human sE-selectin/CD62E, Human sICAM-1/CD54, Human sVCAM-1 (RD System Europe, Abingdon, UK), von Willebrandův faktor (vWF) (Corgenix, Broomfield, USA) a matrix metaloproteázy MMP2 a MMP9 (Quantikine Immunoassay, RD Systems, Minneapolis, MN, USA). Albuminurie byla stanovena po vyloučení močové infekce z ranního vzorku turbidimetricky a byl vypočten poměr močového albuminu/kreatininu (ACR). Za pozitivní výsledek byl považován nález  $\text{ACR} > 3\text{ g/mol}$  kreatininu. K dalším analýzám byla data vzhledem k logaritmickému rozložení logaritmována.

Renální funkce (eGFR) byla vypočtena dle v dané době ve Všeobecné fakultní nemocnici doporučené rovnice MDRD (Levey A. S. et al., 1999). Rutinní biochemické parametry byly stanovovány v séru komerčně dostupnými kity dle výrobcem doporučených instrukcí a certifikovaných postupů v centrální biochemické laboratoři ÚLBLD 1. LF UK a VFN. Většina analytů byla stanovena v analyzátoru Modular Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo). Sérové koncentrace CRP byly stanovovány turbidimetricky, ALT a AST dle metody modifikované podle



International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) s přidáním pyridoxal 5-fosfátu, celkový bilirubin byl měřen reakcí se stabilní diazoniovou solí, sérový kreatinin pomocí Jaffeho reakce. Kyselina močová byla stanovena enzymaticky s následnou fotometrickou detekcí, zatímco koncentrace urey byla měřena UV esejí s ureázou.

Glykémie nalačno byla měřena analyzátozem Super GLAmbulance (Dr. Müller Gerätebau, Freital, Německo) a glykovaný hemoglobin HbA<sub>1c</sub> na HPLC Variant II (Biorad, Francie).

### 5.1.2 Molekulárně-genetické metody

U vyšetřovaných osob byla DNA izolována z lymfocytů periferní krve standardní vysolovací metodou (Miller S. A. et al., 1988). Koncentrace izolované DNA byla měřena spektrofotometrem ND-1000 (NanoDrop).

Gen *GLO1* se nachází na chromozomu 6p21.2. V případě polymorfismu rs4746 je wild type alela A nahrazena mutovanou alelou C. Polymorfismus byl stanovován metodou PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism analysis) dle popsaného postupu (Germanova A. et al., 2009, Kalousova M. et al., 2008). Restrikční analýza využívá specifické restriktázy štěpící DNA. Přítomnost polymorfismu ovlivní možnost konkrétní restrikce, čímž vznikají různě dlouhé amplifikované fragmenty DNA.

Gen FN3K se nachází na chromozomu 17q25. Analýza DNA byla provedena pomocí RealTime PCR a TaqManovou genotypizací s úspěšností 95 % (v rozmezí 91 – 98 %). Metoda je založena na detekci fluorescence uvolňující se v přímé úměře k množství amplifikované DNA v průběhu PCR reakce.

### 5.1.3 Fyzikální metody

Kožní autofluorescence (skin autofluorescence, SAF) byla měřena opakovaně na 3 různých místech předloktí nedominantní horní končetiny pomocí AGE Readeru (DiagnOptics BV, Groningen, Holandsko) dle doporučení výrobce (Mulder D. J. et al., 2006). Samotné měření je zcela neinvazivní a trvá 2 – 3 minuty.

K měření autofluorescence oční čočky (LAF) byl využit biomikroskop ClearPath DS-120 (Freedom Meditech, San Diego, USA), který neinvazivně stanovuje autofluorescenci levé oční čočky, která odráží akumulaci AGEs v čočce (Burd J. et al., 2012).

## 6 Výsledky

### 6.1 Studie 1: RAGE a RAGE ligandy

U pacientů s diabetem byly pozorovány významně vyšší markery endotelové dysfunkce, zatímco rozdíly mezi diabetiky 1. a 2. typu nebyly statisticky významné (**vWF**:  $114 \pm 48$  [DM1],  $127 \pm 56$  [DM2],  $88 \pm 32$   $\mu\text{g/l}$  [kontroly],  $p < 0,0005$ ; **VCAM-1**:  $915 \pm 450$  [DM1],  $848 \pm 342$  [DM2],  $365 \pm 70$   $\mu\text{g/l}$  [kontroly],  $p < 0,0001$ ) i ligand RAGE receptoru **EN-RAGE** ( $250 \pm 197$  [DM1],  $292 \pm 207$  [DM2],  $109 \pm 66$   $\mu\text{g/l}$  [kontroly],  $p < 0,0001$ ), resp. proteáza **MMP2** ( $287 \pm 108$  [DM1],  $318 \pm 118$  [DM2],  $190 \pm 31$   $\mu\text{g/l}$  [kontroly],  $p < 0,0001$ ). Naproti tomu **HMGB1** bylo vyšší jen u diabetiků 2. typu ( $2,23 \pm 1,65$  [DM1],  $2,59 \pm 1,96$  [DM2],  $1,60 \pm 0,96$   $\mu\text{g/l}$  [kontroly],  $p < 0,02$ ) (tabulka 1).

Koncentrace **sRAGE** byla významně vyšší u diabetu 1. typu ( $1137 \pm 532$  [DM1],  $995 \pm 519$  [DM2],  $824 \pm 309$   $\mu\text{g/l}$  [kontroly],  $p < 0,01$ ), u obou skupin diabetu významně pozitivně souvisela s dobou trvání diabetu ( $r = 0,43$ ,  $p = 0,01$ ). Obzvláště významná elevace sRAGE byla pozorována u pacientů s diabetem a přítomností albuminurie.

Poprvé byla popsána významná inverzní závislost mezi metaloproteázami MMP2 a MMP9 u obou typů diabetu (DM1:  $r = -0,6$ ,  $p < 0,002$ ; DM2:  $r = -0,8$ ,  $p < 0,001$ ), jež se podílejí na vzniku sRAGE, ale i degradaci extracelulární matrix při neovaskularizaci.

	DM1 (n=45)	DM2 (n=66)	Kontroly (n=43)	ANOVA p
sRAGE (ng/l)	1137±532 <sup>b</sup>	995±519	824±309	0,011
HMGB1 (µg/l)	2.23±1.65	2.59±1.96 <sup>b</sup>	1.60±0.96	0,011
EN-RAGE (µg/l)	250±197 <sup>c</sup>	292±207 <sup>c</sup>	109±66	<0,0001
vWF (µg/l)	114±48 <sup>a</sup>	127±56 <sup>c</sup>	88±32	0,0004
MMP2 (µg/l)	287±108 <sup>c</sup>	318±118 <sup>c</sup>	190±31	<0,0001
MMP9 (µg/l)	505±429	476±427	609±271	ns
ICAM-1 (µg/l)	260±84	296±176 <sup>b</sup>	206±64	0,002
VCAM-1 (µg/l)	915±450 <sup>c</sup>	848±342 <sup>c</sup>	365±70	<0,0001
P-selektin (µg/l)	113±34 <sup>a</sup>	116±41	140±76	0,028
E-selektin (µg/l)	29±14 <sup>bx</sup>	40±16	40±19	0,001
<p>Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SD. Byla provedena jednocestná ANOVA s Bonferroniho post-hoc testy mezi pacienty s diabetem a kontrolami: <sup>a</sup>p&lt;0,05, <sup>b</sup>p&lt;0,01, <sup>c</sup>p&lt;0,001; resp. mezi diabetiky 1. a 2. typu: <sup>x</sup>p&lt;0,01.</p> <p>EN-RAGE, Extracellular Newly identified RAGE binding Protein; HMGB1, high mobility group box 1; ICAM-1, intercelulární adhezní molekula; MMP, matrix metaloproteázy; sRAGE, solubilní receptor konečných produktů pokročilé glykace; VCAM-1, vaskulární adhezní molekula; vWF, von Willebrandův faktor.</p>				

**Tabulka 1:** Parametry RAGE a endotelové dysfunkce v jednotlivých skupinách

## 6.2 Studie 2: Polymorfizmy FN3K a GLO1

Ve všech vyšetřovaných skupinách (DM1, DM2, kontroly) byly genotypové frekvence polymorfizmů *FN3K* i *GLO1* v Hardy-Weinbergově rovnováze. Ve studovaných skupinách nebyly nalezeny rozdíly v genotypových a alelických frekvencích jednotlivých polymorfizmů *FN3K* (rs1056534), *FN3K* (rs3848403) a *GLO1* (rs4746). Rozdíly nebyly patrné ani při rozdělení pacientů dle absence či přítomnosti chronických mikrovaskulárních (nefropatie, neuropatie, retinopatie) a makrovaskulárních (ischemická choroba srdeční, ischemická choroba dolních končetin, iktus) komplikací.

Byly pozorovány významně nižší koncentrace sRAGE u diabetiků s polymorfizmem *FN3K* rs1056534 a naopak vyšší koncentrace sRAGE u polymorfizmu *FN3K* rs3848403 (tabulka 2). Zatímco GG a CG genotypy *FN3K* rs1056534 s mutovanou G alelou byly asociovány s významných poklesem sRAGE (GG: 1055 ± 458 a CG: 983 ± 363 vs. CC: 1796 ± 987 ng/l;  $p < 0,0001$ ), u *FN3K* rs3848403 polymorfizmu byl TT genotyp s mutovanou T alelou spojen s významně vyšší koncentrací sRAGE (TT: 1365 ± 852 vs. CT: 1016 ± 401 a CC: 1087 ± 508 ng/l;  $p = 0,05$ ).

Polymorfizmus *GLO1* rs4746 nebyl asociován s koncentrací sRAGE. Naopak byla pozorována souvislost tohoto polymorfizmu s koncentracemi adhezních molekul odrážejících endotelovou dysfunkci.

sRAGE (ng/l)		Diabetes (n=102)	Kontroly (n=24)
<b>FN3K</b> (rs1056534)	<b>CC</b>	1796 ± 987	370 ± 135
	<b>GG</b>	1055 ± 458	953 ± 439
	<b>CG</b>	983 ± 363	811 ± 184
	<b>ANOVA</b>	<b>p&lt;0,0001</b>	ns
<b>FN3K</b> (rs3848403)	<b>CC</b>	1087 ± 508	1265 ± 254
	<b>TT</b>	1365 ± 852	643 ± 128
	<b>CT</b>	1016 ± 401	701 ± 266
	<b>ANOVA</b>	<b>p=0,05</b>	ns
<b>GLO1</b> (rs 4746)	<b>AA</b>	1164 ± 601	853 ± 115
	<b>CC</b>	1035 ± 579	645 ± 302
	<b>AC</b>	1104 ± 449	954 ± 440
	<b>ANOVA</b>	ns	ns

**Tabulka 2:** Koncentrace sRAGE u osob s diabetem a bez diabetu dle genotypu.

### 6.3 Studie 3: Kožní autofluorescence

Kožní autofluorescence (SAF) byla u pacientů s diabetem 1. a 2. typu významně vyšší oproti zdravým kontrolám ( $2,39 \pm 0,54$ ,  $2,63 \pm 0,73$  vs.  $1,96 \pm 0,33$  AU;  $p < 0,0001$ ), zatímco rozdíl mezi jednotlivými typy diabetu nebyl významný. Podobně se ani sRAGE či parametry endotelové aktivace/dysfunkce mezi diabetiky 1. a 2. typu příliš nelišily.

Pro další analýzy byly osoby s oběma typy diabetu posuzovány dohromady, a naopak rozděleny dle (ne)přítomnosti albuminurie. U diabetiků s pozitivní albuminurií (A+) byla pozorována významně vyšší kožní autofluorescence i sRAGE oproti osobám bez albuminurie (A-) (tabulka 3).

Endotelová aktivace/dysfunkce byla hodnocena pomocí parametrů vWF, ICAM-1 a VCAM-1. U každého z těchto parametrů byla na základě používaných zvyklostí stanovena hodnota určující přítomnost endotelové aktivace/dysfunkce, konkrétně aktivita vWF > 110 %, koncentrace ICAM-1 > 300 µg/l a koncentrace VCAM-1 > 800 µg/l. Významně vyšší kožní autofluorescence byla pozorována ve všech podskupinách se zvýšenými markery endotelové aktivace/dysfunkce nad uvedené hodnoty – u **vWF** byla kožní autofluorescence (SAF)  $2,63 \pm 0,55$  vs.  $2,27 \pm 0,52$  AU,  $p < 0,02$ , u **ICAM-1**  $2,91 \pm 0,48$  vs.  $2,31 \pm 0,50$  AU,  $p < 0,001$ , a u **VCAM-1**  $2,61 \pm 0,63$  vs.  $2,30 \pm 0,42$  AU,  $p < 0,05$ . Naopak hodnoty glykovaného hemoglobinu HbA<sub>1c</sub> se v těchto podskupinách nelišily.

Korelační analýza ukázala jen mírnou závislost mezi kožní autofluorescencí (SAF) a glykovaným hemoglobinem HbA<sub>1c</sub> u DM2 ( $r = 0,41$ ,  $p < 0,01$ ), ale nikoliv u DM1 ( $r = 0,22$ , ns). V žádné skupině nebyla prokázána souvislost mezi kožní autofluorescencí a koncentrací fruktosaminu či glykémie nalačno. Naopak je známá závislost kožní autofluorescence na věku vyšetřovaných osob, což bylo potvrzeno jak u zdravých kontrol ( $r = 0,73$ ,  $p < 0,0005$ ), tak u pacientů s diabetem 1. typu ( $r = 0,54$ ,  $p < 0,0001$ ), statisticky nevýznamně pak i u pacientů s diabetem 2. typu ( $r = 0,22$ , ns). U osob s diabetem 1. i 2. typu kožní autofluorescence významně pozitivně korelovala se závažností albuminurie vyjádřené poměrem albumin/kreatinin (ACR) ( $r = 0,34$ ,  $p < 0,05$ ;  $r = 0,44$ ,  $p < 0,01$ ) a inverzně s glomerulární filtrací vyjádřené pomocí eGFR ( $r = -0,48$ ,  $p < 0,001$ ;  $r = -0,30$ ,  $p = 0,05$ ).

V žádné skupině nebyla zjištěna souvislost mezi kožní autofluorescencí a pohlavím, krevním tlakem či BMI. Proměnné, které v univariační analýze korelovaly s kožní autofluorescencí s  $p < 0,05$  byly dále hodnoceny v regresní analýze. Z těchto proměnných byla kožní autofluorescence u osob s diabetem asociována pouze s věkem ( $\beta = 0,33$ ;  $p < 0,002$ ), sRAGE ( $\beta = 0,36$ ;  $p < 0,0002$ ), a albuminurií ( $\beta = 0,23$ ;  $p < 0,02$ ) ( $R^2 = 0,38$ ), zatímco u kontrol jen s věkem ( $\beta = 0,55$ ;  $p < 0,03$ ;  $R^2 = 0,62$ ).

	A+ (n=19)	A- (n=69)	Kontroly (n=20)	ANOVA p
SAF (AU)	2,84 ± 0,80 <sup>cx</sup>	2,41 ± 0,56 <sup>b</sup>	1,96 ± 0,33	<0,0001
Albumin/kreatinin (g/mol)	13,2 <sup>cz</sup> (3,9-44,0)	0,7 (0,3-1,6)	0,5 (0,2-1,1)	<0,0001
HbA <sub>1c</sub> (mmol/mol, IFCC)	90 ± 18 <sup>cz</sup>	68 ± 14 <sup>c</sup>	39 ± 5	<0,0001
sRAGE (ng/l)	1457 ± 754 <sup>x</sup>	1066 ± 532	1163 ± 537	<0,05
vWF (%)	137 ± 47 <sup>b</sup>	114 ± 45	93 ± 25	0,007
ICAM-1 (µg/l)	324 ± 102 <sup>cy</sup>	251 ± 70	223 ± 82	0,0003
VCAM-1 (µg/l)	965 ± 408 <sup>c</sup>	832 ± 400 <sup>c</sup>	392 ± 91	<0,0001
P-selektin (µg/l)	102 ± 33 <sup>b</sup>	109 ± 37 <sup>b</sup>	145 ± 52	0,0008
E-selektin (µg/l)	39 ± 18	31 ± 15 <sup>a</sup>	41 ± 15	0,016
<p>Výsledky jsou uvedeny jako průměr±SD, popř. jako průměr s 1 SD rozpětím. Byla provedena jednocestná ANOVA s LSD post-hoc testy mezi pacienty s diabetem a kontrolami: <sup>a</sup>p&lt;0,05, <sup>b</sup>p&lt;0,01, <sup>c</sup>p&lt;0,001 a mezi A+ a A-: <sup>x</sup>p&lt;0,05, <sup>y</sup>p&lt;0,01, <sup>z</sup>p&lt;0,001.</p> <p>AU, arbitrární jednotky; HbA<sub>1c</sub>, glykovaný hemoglobin; ICAM-1, intercelulární adhezní molekula; sRAGE, solubilní receptor konečných produktů pokročilé glykace; SAF, kožní autofluorescence; VCAM-1, vaskulární adhezní molekula; vWF, von Willebrandův faktor.</p>				

**Tabulka 3:** Kožní autofluorescence a další parametry v podskupinách dle nepřítomnosti (A-) či přítomnosti (A+) albuminurie.

## 7 Diskuse

Naše studie prokázala změny v koncentracích sRAGE a RAGE ligandů EN-RAGE a HMGB1 u pacientů s diabetem 1. a 2. typu. Průměrné hodnoty těchto parametrů byly obecně vyšší v diabetické populaci, byť ne vždy se statistickou významností. Výrazně vyšší sRAGE bylo pozorováno u pacientů s albuminurií >3 g/mol kreatininu. Naproti tomu v jiné studii (Marcovecchio M. L. et al., 2009) bylo prokázáno snížení esRAGE u pacientů s diabetem 1. typu a přítomnou albuminurií. Vznik esRAGE a sRAGE se však liší – zatímco esRAGE vzniká alternativním sestřihem genu *AGER* (Raucci A. et al., 2008), sRAGE je odštěpován proteázami od transmembránového RAGE receptoru, a tím i různé mechanismy se mohou uplatňovat v různých stádiích rozvoje diabetu a diabetických komplikací.

V minulosti byla opakovaně prokázána asociace mezi polymorfizmem rs2070600 557G/A RAGE genu (*AGER*) a koncentrací sRAGE (Gaens K. H. J. et al., 2009, Jang Y. et al., 2007, Krechler T. et al., 2010), avšak ani rozsáhlá meta-analýza s mnohatisícovými soubory osob neprokázala asociaci mezi uvedeným polymorfizmem rs2070600 (557G/A, G82S) i dalšími RAGE polymorfizmy rs1800625 (-429T/C), rs1800624 (-374T/A) a rizikem rozvoje diabetu (Niu W. et al., 2012).

Významným faktorem ovlivňujícím koncentraci sRAGE v krvi je funkce ledvin. Opakovaně bylo v minulosti prokázáno, že snížená funkce ledvin vyjádřená vzestupem kreatininu, popř. sníženou glomerulární filtrací, přispívá ke zvýšení koncentrace sRAGE (Kalousova M. et al., 2006, Kankova K. et al., 2008, Wannamethee S. G. et al., 2017). Recentní velká průřezová studie na americké populaci (Loomis S. J. et al., 2017) rovněž ukazuje, že koncentrace sRAGE je kromě genetických faktorů významně závislá na aktuálním zatížení organismu zánětem, a dále právě renálních funkcích. Navíc byla rovněž nezávisle na jiných rizikových faktorech opakovaně prezentována i významná asociace mezi sRAGE a rozvojem diabetické nefropatie (Klein R. et al., 2017, Thomas M. C. et al., 2015).

Diabetes v organismu akceleruje mírný chronický zánět, který stimuluje nejen rozvoj endotelových změn, ale i dalších abnormalit např. v interakci RAGE receptoru, jeho ligandů či metaloproteináz. Koncentrace těchto

jednotlivých markerů však často závisí na aktuálním stavu organismu a nemusí odrážet dlouhodobou prognózu jedince s diabetem.

Naše práce jako první ukázala významnou souvislost mezi polymorfizmy deglykačního enzymu FN3K (rs1056534) a (rs3848403) a koncentrací sRAGE u osob s diabetem. Problematika stanovení a odlišení sRAGE a esRAGE již byla diskutována výše. Naopak genotypové frekvence se ve studovaných skupinách významně nelišily.

Rovněž jsem poprvé publikovali významné rozdíly v markerech endotelové aktivace/dysfunkce mezi osobami s různými genotypy polymorfizmu *GLO1* (rs4746). Interpretace však není jednoznačná, neboť u pacientů s diabetem 1. typu mutovaná alela vedla ke snížení koncentrací ICAM-1 a P-selektinu, zatímco u pacientů s diabetem 2. typu byla snížena koncentrace E-selektinu a VCAM-1 naopak stoupal. Je pravděpodobné, že účinnost deglykačních enzymů není ovlivněna jen (ne)přítomností jejich polymorfizmů, ale často spíše dalšími mechanizmy regulujícími genovou expresi či samotnou enzymatickou aktivitu. Podobně je i aktuální koncentrace adhezních molekul spíše závislá na dalších dynamických faktorech jako např. oxidační stres či závažnost cévního poškození.

Nepřítomnost významnějších rozdílů v genotypových a alelických frekvencích polymorfizmu *GLO1* (rs4746) byla v minulosti pozorována u žen s karcinomem prsu (Germanova A. et al., 2009), zatímco u osob s diabetem toto nebylo známo. Naproti tomu byla u hemodialyzovaných osob s CC genotypem polymorfizmu *GLO1* (rs4746) vyšší prevalence kardiovaskulárního onemocnění (Kalousova M. et al., 2008). Podobně častější byl oproti zdravým osobám pozorován CC genotyp u osob se světlobuněčným karcinomem ledviny (Chocholaty M. et al., 2015).

Je pravděpodobné, že celkový efekt enzymů deglykačních systémů a tím i jejich podíl na rozvoji cévních komplikací je ovlivňován nejen přítomností polymorfizmů, ale i dalšími molekulárními mechanizmy regulujícími např. genovou expresi či enzymovou aktivitu. Samotný polymorfizmus nemusí mít na aktivitu enzymu vliv, tak jak kupříkladu ukázala recentní studie s polymorfizmem FN3K rs1056534 (Cikomola J. C. et al., 2017).



V publikaci věnované kožní autofluorescenci jsme jako první prezentovali významnou elevaci kožní autofluorescence u diabetiků s pozitivními markery endotelové aktivace/dysfunkce, přitom u nich nebyl pozorován rozdíl v glykovaném hemoglobinu HbA<sub>1c</sub>. Podobně byla kožní autofluorescence významně vyšší u diabetiků s albuminurií, tedy ukazatelem diabetické nefropatie. Toto zvýšení přitom zůstalo významné i po adjustaci na renální funkce, a tedy nelze přičíst jen zhoršené clearance AGEs ledvinami. Kožní autofluorescence se nelišila mezi pacienty s diabetem 1. a 2. typu, byla však významně vyšší než v kontrolní skupině.

Jen částečná souvislost mezi kožní autofluorescencí a glykovaným hemoglobinem HbA<sub>1c</sub>, tedy markerem dlouhodobé průměrné glykémie, byla pozorována u diabetu 2. typu, zatímco u diabetu 1. typu nebyla asociace ani statisticky významná. Podobné výsledky ukázaly jak další studie s kožní autofluorescencí (Semedo C. D. et al., 2017), tak naše srovnání s autofluorescencí oční čočky (Skrha J., Jr. et al., 2015). Zatímco HbA<sub>1c</sub> odráží průměrnou glykémii v posledních 2 – 3 měsících, parametr kožní autofluorescence odráží dlouhodobou glykaci podkoží minimálně v horizontu let. Proto přináší i jinou klinickou informaci o možném dalším rozvoji komplikací. Nedávno byla publikována první studie prokazující pozitivní asociaci mezi kožní autofluorescencí a erektilní dysfunkcí, tedy jednou z nejčasnějších cévních komplikací diabetu (Kouidrat Y. et al., 2017).

Poprvé jsme ukázali v obou skupinách diabetiků významnou závislost mezi kožní autofluorescencí a sRAGE. O kauzálním vztahu mezi autofluorescencí a sRAGE lze však jen spekulovat, zda se jedná o reaktivní zvýšení sRAGE v odpovědi na větší glykační zátěž organismu či jde jen o nespecifický ukazatel chronického zánětu.

V naší studii jsme nesrovnávali míru akumulace AGEs v podkoží měřené pomocí kožní autofluorescence s kožními biopsiemi, ale již v minulosti bylo prokázáno, že kožní autofluorescence silně koreluje s množstvím fluorescenčních i nefluorescenčních AGEs v podkoží (Meerwaldt R. et al., 2004).

Parametr kožní autofluorescence je jistě klinicky relevantní a dobře odráží dlouhodobou glykační zátěž organismu, navíc samotné měření je rychlé a

neinvazivní. Je pravděpodobné, že je značně ovlivněn nejen samotnými AGEs, ale i interakcí mezi AGEs s receptory, popř. se uplatňují i další mechanismy, např. endotelová aktivace/dysfunkce, deglykační mechanismy a další doposud ne zcela detailně popsané dráhy.

Opakovaně se diskutuje o klinicky relevantních biomarkerech glykace. Detekce různých AGEs v krvi by jistě i v klinické praxi dokázala do značné míry predikovat mikrovaskulární i makrovaskulární komplikace, bohužel na rozdíl od dnes již relativně standardizovaného měření glykovaného hemoglobinu jsou různé kity pro AGEs značně nestandardizované a přesnější metody detekce (např. tandemová hmotnostní spektrometrie) pro rutinní praxi vesměs nepoužitelné (Welsh K. J. et al., 2016). Právě proto může být kožní autofluorescence klinicky nadějnou alternativou.

## 8 Závěry

Diabetes mellitus je onemocnění, jehož vysoká morbidita je způsobena hlavně chronickými cévními komplikacemi. Patogeneze cévního poškození u diabetu je dle aktuálních poznatků velice komplexní a rozhodně nelze říct, že jediným faktorem je dlouhodobá hyperglykémie.

Je zřejmé, že genetická predispozice významně ovlivňuje, jak bude konkrétní pacient náchylný k rozvoji cévních komplikací. Dlouhodobá hyperglykémie přispívá k výraznější glykaci proteinů, nukleových kyselin a dalších struktur, a význam ochranných deglykačních mechanismů je proto veliký.

Cílem dizertační práce bylo posouzení významnosti některých časnějších biologických markerů cévního postižení u pacientů s diabetem 1. a 2. typu a jejich souvislost s případnými mikroangiopatickými změnami. Níže uvádím hlavní výsledky.

- 1) Byly prokázány významné rozdíly v koncentracích markerů endotelové dysfunkce a ligandů receptoru RAGE mezi osobami s diabetem a bez diabetu, zatímco rozdíly mezi diabetem 1. typu a 2. typu nebyly vždy přesvědčivé.
- 2) Koncentrace sRAGE byla významně vyšší u diabetu 1. typu a u obou skupin diabetu významně pozitivně souvisela s dobou trvání diabetu. Obzvláště významná elevace sRAGE byla pozorována u pacientů s diabetem a diabetickou nefropatií vyjádřenou přítomnou albuminurií. Konkrétní příčina či biologická role tohoto zvýšení však zatím zůstává nejasná.
- 3) U osob s diabetem 1. a 2. typu nebyly nalezeny rozdíly v genotypových a alelických frekvencích jednotlivých polymorfizmů *FN3K* (rs1056534), *FN3K* (rs3848403) a *GLO1* (rs4746). Rozdíly nebyly patrné ani při rozdělení pacientů dle absence či přítomnosti chronických mikrovaskulárních (nefropatie, neuropatie, retinopatie) a makrovaskulárních (ischemická choroba srdeční, ischemická choroba dolních končetin, iktus) komplikací.

- 4) U diabetiků s polymorfizmem *FN3K* rs1056534 byly poprvé popsány významně nižší koncentrace sRAGE, a naopak vyšší koncentrace sRAGE u polymorfizmu *FN3K* rs3848403. Rovněž byla prokázána asociace mezi polymorfizmem *GLO1* (rs4746) a markery endotelové aktivace/dysfunkce. Přímá asociace určitého polymorfizmu s konkrétní formou mikroangiopatie však nalezena nebyla.
- 5) Kožní autofluorescence (SAF) byla u pacientů s diabetem 1. a 2. typu významně vyšší oproti zdravým kontrolám, zatímco rozdíl mezi jednotlivými typy diabetu nebyl významný. Naproti tomu souvislost mezi kožní autofluorescencí a glykovaným hemoglobinem nebyla přesvědčivá.
- 6) Významně vyšší kožní autofluorescence (tedy akumulace AGEs v podkoží) byla pozorována u diabetiků s pozitivní albuminurií. AGEs se tak nejen kauzálně podílejí na rozvoji cévních komplikací, ale mohou být i vhodným markerem rozvoje komplikací.

## 9 Použitá literatura

Burd, J., Lum, S., Cahn, F. and Igotz, K. Simultaneous noninvasive clinical measurement of lens autofluorescence and rayleigh scattering using a fluorescence biomicroscope. *J Diabetes Sci Technol* **6**, 1251-1259 (2012).

Cikomola, J. C., Kishabongo, A. S., Vandepoele, K., De Mulder, M., Katchunga, P. B., Laukens, B., Van Schie, L., Grootaert, H., Callewaert, N., Speeckaert, M. M. and Delanghe, J. R. A simple colorimetric assay for measuring fructosamine 3 kinase activity. *Clin Chem Lab Med* **55**, 154-163 (2017).

Gaens, K. H. J., Ferreira, I., van der Kallen, C. J. H., van Greevenbroek, M. M. J., Blaak, E. E., Feskens, E. J. M., Dekker, J. M., Nijpels, G., Heine, R. J., t Hart, L. M., de Groot, P. G., Stehouwer, C. D. A. and Schalkwijk, C. G. Association of polymorphism in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene with circulating RAGE levels. *J Clin Endocr Metab* **94**, 5174-5180 (2009).

Germanova, A., Tesarova, P., Jachymova, M., Zvara, K., Zima, T. and Kalousova, M. Glyoxalase I Glu111Ala Polymorphism in Patients with Breast Cancer. *Cancer Invest* **27**, 655-660 (2009).

Haim, M., Tanne, D., Boyko, V., Reshef, T., Goldbourt, U., Leor, J., Mekori, Y. A. and Behar, S. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and long-term risk of acute coronary events in patients with chronic coronary heart disease - Data from the bezafibrate infarction prevention (BTP) study. *J Am Coll Cardiol* **39**, 1133-1138 (2002).

Chocholaty, M., Jachymova, M., Schmidt, M., Havlova, K., Krepelova, A., Zima, T., Babjuk, M. and Kalousova, M. Polymorphisms of the receptor for advanced glycation end-products and glyoxalase I in patients with renal cancer. *Tumor Biol* **36**, 2121-2126 (2015).

IDF. IDF Diabetes Atlas, 137s. (2011)

IDF. IDF Diabetes Atlas, 140s. (2015)

Jang, Y., Kim, J. Y., Kang, S. M., Kim, J. S., Chae, J. S., Kim, O. Y., Koh, S. J., Lee, H. C., Ahn, C. W., Song, Y. D. and Lee, J. H. Association of the Gly82Ser polymorphism in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene with circulating levels of soluble RAGE and inflammatory markers in nondiabetic and nonobese Koreans. *Metabolism-Clinical and Experimental* **56**, 199-205 (2007).

Kalousova, M., Germanova, A., Jachymova, M., Mestek, O., Tesar, V. and Zima, T. A419C (E111A) polymorphism of the glyoxalase I gene and vascular complications in chronic hemodialysis patients. *Ann NY Acad Sci* **1126**, 268-271 (2008).

Kalousova, M., Hodkova, M., Kazderova, M., Fialova, J., Tesar, V., Dusilova-Sulkova, S. and Zima, T. Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function. *Am J Kidney Dis* **47**, 406-411 (2006).

Kankova, K., Kalousova, M., Hertlova, M., Krusova, D., Olsovsky, J. and Zima, T. Soluble RAGE, diabetic nephropathy and genetic variability in the AGER gene. *Arch Physiol Biochem* **114**, 111-119 (2008).

King, H., Aubert, R. E. and Herman, W. H. Global burden of diabetes, 1995-2025 - Prevalence, numerical estimates, and projections. *Diab Care* **21**, 1414-1431 (1998).

Klein, R., Horak, K., Lee, K. E., Danforth, L., Cruickshanks, K. J., Tsai, M. Y., Gangnon, R. E. and Klein, B. E. K. The Relationship of Serum Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products (sRAGE) and Carboxymethyl Lysine (CML) to the Incidence of Diabetic Nephropathy in Persons With Type 1 Diabetes. *Diab Care* **40**, E117-E119 (2017).

Koudrat, Y., Zaitouni, A., Amad, A., Diouf, M., Desaillood, R., Loas, G. and Lalau, J. D. Skin autofluorescence (a marker for advanced glycation end products) and erectile dysfunction in diabetes. *J Diabetes Complicat* **31**, 108-113 (2017).

Krechler, T., Jachymova, M., Mestek, O., Zak, A., Zima, T. and Kalousova, M. Soluble receptor for advanced glycation end-products (sRAGE) and polymorphisms of RAGE and glyoxalase I genes in patients with pancreas cancer. *Clin Biochem* **43**, 882-886 (2010).

Levey, A. S., Bosch, J. P., Lewis, J. B., Greene, T., Rogers, N. and Roth, D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* **130**, 461-470 (1999).

Loomis, S. J., Chen, Y., Sacks, D. B., Christenson, E. S., Christenson, R. H., Rebholz, C. M. and Selvin, E. Cross-sectional Analysis of AGE-CML, sRAGE, and esRAGE with Diabetes and Cardiometabolic Risk Factors in a Community-Based Cohort. *Clinical Chemistry* **63**, 980-989 (2017).

Marcovecchio, M. L., Giannini, C., Dalton, R. N., Widmer, B., Chiarelli, F. and Dunger, D. B. Reduced endogenous secretory receptor for advanced glycation end products (esRAGE) in young people with Type 1 diabetes developing microalbuminuria. *Diab Med* **26**, 815-819 (2009).

Meerwaldt, R., Graaff, R., Oomen, P. H. N., Links, T. P., Jager, J. J., Alderson, N. L., Thorpe, S. R., Baynes, J. W., Gans, R. O. B. and Smit, A. J. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia* **47**, 1324-1330 (2004).

Miller, S. A., Dykes, D. D. and Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* **16**, 1215-1215 (1988).

Mulder, D. J., Van de Water, T., Lutgers, H. L., Graaff, R., Gans, R. O., Zijlstra, F. and Smit, A. J. Skin autofluorescence, a novel marker for glycemic and oxidative stress-derived advanced glycation endproducts: An overview of current clinical studies, evidence, and limitations. *Diabetes Technol The* **8**, 523-535 (2006).

Niu, W., Qi, Y., Wu, Z., Liu, Y., Zhu, D. and Jin, W. A meta-analysis of receptor for advanced glycation end products gene: four well-evaluated polymorphisms with diabetes mellitus. *Mol Cell Endocrinol* **358**, 9-17 (2012).

Quah, J. H., Luo, N., Ng, W. Y., How, C. H. and Tay, E. G. Health-related quality of life is associated with diabetic complications, but not with short-term diabetic control in primary care. *Ann Acad Med Singapore* **40**, 276-286 (2011).

Raucci, A., Cugusi, S., Antonelli, A., Barabino, S. M., Monti, L., Bierhaus, A., Reiss, K., Saftig, P. and Bianchi, M. E. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *Faseb Journal* **22**, 3716-3727 (2008).

Semedo, C. D., Webb, M., Waller, H., Khunti, K. and Davies, M. Skin autofluorescence, a non-invasive marker of advanced glycation end products: clinical relevance and limitations. *Postgrad Med J* **93**, 289-294 (2017).

Skrha, J., Jr., Soupal, J., Prazny, M. and Skrha, J. Glycation of lens proteins in diabetes and its non-invasive assessment - first experience in the Czech Republic. *Vnitr Lek* **61**, 346-350 (2015).

Thomas, M. C., Woodward, M., Neal, B., Li, Q., Pickering, R., Marre, M., Williams, B., Perkovic, V., Cooper, M. E., Zoungas, S., Chalmers, J., Hillis, G. S. and Grp, A. C. Relationship Between Levels of Advanced Glycation End Products and Their Soluble Receptor and Adverse Outcomes in Adults With Type 2 Diabetes. *Diab Care* **38**, 1891-1897 (2015).

Wannamethee, S. G., Welsh, P., Papacosta, O., Ellins, E. A., Halcox, J. P. J., Whincup, P. H. and Sattar, N. Circulating soluble receptor for advanced glycation end product: Cross-sectional associations with cardiac markers and subclinical vascular disease in older men with and without diabetes. *Atherosclerosis* **264**, 36-43 (2017).

Welsh, K. J., Kirkman, M. S. and Sacks, D. B. Role of Glycated Proteins in the Diagnosis and Management of Diabetes: Research Gaps and Future Directions. *Diab Care* **39**, 1299-1306 (2016).

Widlansky, M. E., Gokce, N., Keaney, J. F. and Vita, J. A. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* **42**, 1149-1160 (2003).

Zvolský, M. Činnost oboru diabetologie, péče o diabetiky v roce 2012. *ÚZIS* (2013).

## 10 Seznam publikací autora

### 10.1 Publikace s IF, které jsou podkladem dizertační práce (in extenso)

- Škrha J jr., Kalousová M, Švarcová J, Muravská A, Kvasnička J, Landová L, Zima T, Škrha J. Relationship of soluble RAGE and RAGE ligands HMGB1 and EN-RAGE to endothelial dysfunction in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. **2012**;120(5):277-81. **IF = 1,89.**
- Škrha J jr., Muravská A, Flekač M, Horová E, Novák J, Novotný A, Prázný M, Škrha J, Kvasnička J, Landová L, Jáchymová M, Zima T, Kalousová M. Fructosamine 3-kinase and glyoxalase I polymorphisms and their association with soluble RAGE and adhesion molecules in diabetes. *Physiol Res*. **2014**;63 Suppl 2:283-91. **IF = 1,53.**
- 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. *Journal of Diabetes Res*. **2013**, Article ID 650694. **IF = 3,54.**

### 10.2 Publikace s IF, které nejsou podkladem dizertační práce

- Škrha J, Šoupal J, Škrha J jr., Prázný M. Glucose variability, HbA<sub>1c</sub> and microvascular complications. *Rev Endocr Metab Disord*. **2016**;17:103–110. **IF = 5,09.**
- 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**;16(4):198-203. **IF = 2,29.**
- Gáll J, Škrha J jr., Buchal R, Sedláčková E, Verebová K, Pláteník J. Induction of the mitochondrial permeability transition (MPT) by



micromolar iron: Liberation of calcium is more important than NAD(P)H oxidation. *BBA Bioenergetics*. **2012**;1817(9):1537-1549. **IF = 5,47.**

- **Škrha J jr.**, Gáll J, Buchal R, Sedláčková E, Pláteník J. Glucose and its metabolites have distinct effects on the calcium-induced mitochondrial permeability transition. *Folia Biol*. **2011**;57(3):96-103. **IF = 1,15.**

### 10.3 Publikace bez IF, které nejsou podkladem dizertační práce

- **Škrha J jr.**, Škrha J. Kardiovaskulární mortalita u diabetu. *Vnitřní Lék*. **2017**; 63 (6):447-449
- **Škrha J jr.** Novinky v léčbě diabetes mellitus 2. typu perorálními antidiabetiky. *Medicína pro praxi*. **2016**; 13(4): 168–170.
- **Škrha J jr.** Nové léky v diabetologii. *Postgraduální medicína*. **2016**; 18 (2): 22-26.
- **Škrha J jr.** Moderní léčba diabetes mellitus. *Kapitoly z kardiologie pro praktické lékaře*. **2016**; 8(1).
- **Škrha J jr.**, Šoupal J, Prázný M, Škrha J. Glykace proteinů oční čočky u diabetiků a její neinvazivní měření – první zkušenosti v České republice. *Vnitřní Lék*. **2015**; 61 (4):346-350.
- **Škrha J jr.**, Kalousová M, Zima T. Receptor pro konečné produkty pokročilé glykace (RAGE) – klíčový hráč diabetické angiopatie? *Vnitřní Lék*. **2014**; 60(4):782-786.
- Škrha J, Flekač M, **Škrha J jr.** Prevence a léčba makro- a mikrovaskulárních komplikací u diabetiků. *Postgraduální medicína*. **2012**; 14 (3): 64-69