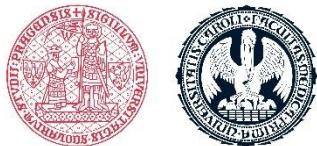


**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



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

**MUDr. Jan Škrha jr.**

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

Pathobiochemistry of diabetes mellitus and its complications  
– oxidative stress, microinflammation and genetic predisposition

Dizertační práce

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

Konzultant: RNDr. Marie Jáchymová, Ph.D.

Praha, 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze své práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 14. 11. 2017

Jan Škrha jr.

**Identifikační záznam:**

ŠKRHA jr., Jan. Patobiochemie diabetes mellitus a jeho komplikací – oxidační stres, mikrozánět a genetická predispozice. [Pathobiochemistry of diabetes mellitus and its complications – oxidative stress, microinflammation and genetic predisposition]. Praha, 2017. 86 s., 3 přílohy. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK 2017. Školitel Kalousová, Marta.

## **Obsah**

1	Abstrakt: .....	7
2	Abstract .....	8
3	Poděkování.....	9
4	Seznam zkratek .....	10
5	Úvod .....	13
6	Patogeneze diabetických cévních komplikací.....	14
6.1	Oxidační stres .....	17
6.2	Mikrovaskulární reaktivita.....	19
6.3	Neenzymatická glykace .....	19
6.3.1	AGEs .....	19
6.3.2	Původ AGEs a jejich osud v organizmu.....	21
6.3.2.1	AGE-R .....	23
6.3.2.2	Scavengerové receptory .....	24
6.3.2.3	RAGE.....	24
6.3.2.3.1	Ligandy RAGE.....	25
6.3.2.3.2	Aktivace RAGE.....	25
6.3.2.4	Degradace AGEs.....	27
6.4	Deglykační mechanizmy.....	27
6.5	Metabolická paměť .....	28
6.6	Možnosti detekce AGEs .....	29
6.6.1	Detekce v séru .....	30
6.6.2	Detekce ve tkáních.....	30
6.6.2.1	Autofluorescence kůže.....	30
6.6.2.2	Autofluorescence oční čočky.....	31
7	Hypotéza a cíle práce .....	32
8	Soubory pacientů a použité metody .....	33
8.1	Soubory pacientů .....	33
8.1.1	Studie 1: RAGE a RAGE ligandy (Příloha 1) .....	33
8.1.2	Studie 2: Polymorfizmy FN3K a GLO1 (Příloha 2).....	34
8.1.3	Studie 3: Kožní autofluorescence (Příloha 3).....	34
8.2	Použité metody .....	34
8.2.1	Biochemické metody .....	34

8.2.1.1	sRAGE .....	34
8.2.1.1.1	Princip metody .....	35
8.2.1.1.2	Reagencie .....	35
8.2.1.1.3	Pracovní postup .....	35
8.2.1.2	EN-RAGE .....	36
8.2.1.2.1	Reagencie .....	36
8.2.1.2.2	Pracovní postup .....	36
8.2.1.3	HMGB1 .....	37
8.2.1.3.1	Reagencie .....	37
8.2.1.3.2	Pracovní postup .....	38
8.2.1.4	Adhezní molekuly .....	38
8.2.1.5	Rutinní metody .....	39
8.2.2	Molekulárně-genetické metody .....	39
8.2.2.1	Izolace DNA .....	39
8.2.2.1.1	Pracovní postup .....	39
8.2.2.2	Měření koncentrace DNA .....	40
8.2.2.3	Polymorfizmus genu glyoxalázy 1 GLO1 rs4746 .....	40
8.2.2.4	Polymorfizmy genu fruktosamin 3-kinázy rs1056534 a rs3848403 .....	41
8.2.3	Fyzikální metody .....	41
8.2.3.1	Kožní autofluorescence .....	41
8.2.3.2	Autofluorescence oční čočky .....	42
8.3	Statistická analýza .....	43
9	Výsledky .....	44
9.1	Studie 1: RAGE a RAGE ligandy (Příloha 1) .....	44
9.2	Studie 2: Polymorfizmy FN3K a GLO1 (Příloha 2) .....	46
9.3	Studie 3: Kožní autofluorescence (Příloha 3) .....	49
10	Diskuze .....	52
10.1	Studie 1: RAGE a RAGE ligandy (Příloha 1) .....	52
10.2	Studie 2: Polymorfizmy FN3K a GLO1 (Příloha 2) .....	53
10.3	Studie 3: Kožní autofluorescence (Příloha 3) .....	54
10.4	Další cíle výzkumu .....	56
11	Závěr .....	57
12	Seznam literatury: .....	59

13	Seznam publikací autora.....	81
13.1	Publikace s IF, které jsou podkladem dizertační práce (in extenso).....	81
13.2	Publikace s IF, které nejsou podkladem dizertační práce .....	81
13.3	Publikace bez IF, které nejsou podkladem dizertační práce .....	82
13.4	Abstrakta autora z mezinárodních kongresů související s dizertační prací .....	83
14	Přílohy .....	86

## **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, kde se kromě dlouhodobě zvýšené glykémie uplatňuje celá řada faktorů. 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 metabolizmu.

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 autofluoresenci 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 vtipování 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.

**Klíčová slova:** cévní komplikace, diabetes mellitus, EN-RAGE, fruktosamin 3-kináza, glykace, glyoxaláza 1, HMGB1, hyperglykémie, kožní autofluorescence, mikroangiopatie, RAGE, sRAGE

## 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.

**Keywords:** vascular complications, diabetes mellitus, EN-RAGE, fructosamine 3-kinase, glycation, glyoxalase 1, HMGB1, hyperglycemia, skin autofluorescence, microangiopathy, RAGE, sRAGE

### **3 Poděkování**

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce prof. MUDr. Martě Kalousové, Ph.D. z Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za odborné vedení, výborné připomínky a podněty jak během celého mého postgraduálního studia, tak při sepisování této dizertační práce. Dík patří rovněž konzultantce RNDr. Marii Jáchymové, Ph.D. za doporučení v molekulárně-biologické části práce.

Zároveň bych chtěl poděkovat přednostovi ÚLBDL prof. Tomáši Zimovi, DrSc., MBA za možnost vědecky pracovat na tomto ústavu.

Můj dík patří rovněž RNDr. Alexandře Muravské, Ph.D. za trpělivou pomoc se základními laboratorními technikami, a stejně tak i celému kolektivu Laboratoře imunochemie a molekulární diagnostiky za asistenci, obzvláště Haně Řehákové, Ludmile Pourové, Evě Němcové a Ditě Hudcové.

Za klinickou část své práce děkuji především kolektivu na III. interní klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, převážně prof. MUDr. Janu Škrhovi, DrSc. za četná odborná doporučení a náměty, a dále pak doc. Martinu Práznému, CSc., Ph.D. a MUDr. Janu Šoupalovi, Ph.D. za připomínky a pomoc s některými vyšetřovacími metodami.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům a obzvláště pak své ženě za neutuchající podporu a trpělivost.

*Tento výstup vznikl s podporou grantů GAUK 623312, Prvouk P25/LF1/2 a Progress Q25 Univerzity Karlovy v Praze a projektů Specifického vysokoškolského výzkumu, t.č. 260370-2017.*

## 4 Seznam zkratek

3-DG	3-deoxyglukoson
ACR	poměr albumin/kreatinin v moči (albumin/creatinine ratio)
ADAM 10	protein 10 s desintegrinovou a metaloproteinázovou doménou (A Desintegrin and Metalloproteinase Domain-containing Protein 10)
ADMA	asymetrický dimethyl arginin
ADP	adenindinukleotidfosfát
AGE-R	receptor konečných produktů pokročilé glykace
AGEs	konečné produkty pokročilé glykace
AMP	adenosinmonofosfát
ANOVA	variační analýza (analysis of variance)
BAP	biologický antioxidační potenciál (Biological Antioxidant Potency)
CCD	zařízení s vázanými náboji (charge-coupled device)
CEL	N-ε-karboxyethyllysin
CML	N-ε-karboxymethyllysin
DAG	diacylglycerol
dROMs	metabolity reaktivního kyslíku (derivat. Reactive Oxygen Metabolites)
EC	extracelulární
eGFR	odhadovaná glomerulární filtrace
EDTA	kyselina ethylendiaminetetraoctová
ELISA	enzymová imunoanalýza (enzyme-linked immunosorbent assay)
eNOS	endotelová NO-syntáza
EN-RAGE	extracelulární nově identifikovaný protein vázající RAGE (Extracellular Newly identified RAGE binding Protein)
ERK	extracelulární signálem regulovaná kináza
esRAGE	endogenně sekernovaný RAGE (endogenous secretory RAGE)
FADH <sub>2</sub>	flavinadenindinukleotid
FEEL-1	scavengerový receptor (link domain-containing scavenger receptor-1)
FN3K	fruktosamin 3-kináza
FORD	ochrana proti volným kyslíkovým radikálům (Free Oxygen Radicals Defend)

FORT	test volných kyslíkových radikálů (Free Oxygen Radicals Testing)
GAPDH	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza
GLO 1 (2)	glyoxaláza 1 (2)
GSH	glutathion
GSSG	glutathion disulfid
HbA <sub>1c</sub>	glykovaný hemoglobin
HDL	lipoprotein o vysoké denzitě (high density lipoprotein)
HMGB1	protein High Mobility Group Box-1
HWE	Hardy-Weinbergovo ekvilibrium
IC	intracelulární
ICAM-1	intercelulární adhezní molekula
IDF	Mezinárodní diabetologická federace (International Diabetes Federation)
IFCC	Mezinárodní federace klinické chemie (International Federation of Clinical Chemistry)
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
IQR	mezikvartilové rozpětí (interquartile range)
JAK2	Janusova kináza 2
LAF	autofluorescence oční čočky (lens autofluorescence)
LDL	lipoprotein o nízké denzitě (low density lipoprotein)
LOX-1(2)	oxidovaný LDL receptor lektinového typu 1(2
LPA	kyselina lysofosfatidová
LPS	lipopolysacharid
MDA	malondialdehyd
mDia-1	savčí průhledný protein 1 (mammalian Diaphanous Protein 1)
miRNA	mikro ribonukleová kyselina
MGO	methylglyoxal
MMP	matrixová metaloproteináza
MnSOD	superoxiddismutáza závislá na mangani
mRNA	messangerová ribonukleová kyselina
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NFκB	nukleární faktor κB
NO	oxid dusnatý

PAI-1	inhibitor 1 aktivátoru plasminogenu (plasminogen activator inhibitor-1)
PARP	polymeráza poly(ADP-ribózy)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PI3K	fosfatidylinositol 3-kináza
PKC	proteinkináza C
RAGE	receptor konečných produktů pokročilé glykace
RFLP	polymorfizmus délky restrikčních fragmentů
ROS	reaktivní kyslíkové radikály, reaktivní formy kyslíku
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
SAF	kožní autofluorescence (skin autofluorescence)
S100B	S100 protein B vázající kalcium
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)
SNP	jednonukleotidový polymorfizmus (Single Nucleotide Polymorphism)
SOD	superoxid dismutáza
sRAGE	solubilní RAGE (soluble RAGE)
Src	nereceptorová tyrosinkináza
STAT3	transkripční faktor (Signal transducer and activator of transcription 3)
Taq	Thermus Aquaticus DNA polymeráza
TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1	transformující růstový faktor $\alpha$ , $\beta$ 1 (transforming growth factor $\alpha$ , $\beta$ 1)
TRIS	trisaminomethan
UCP	odpojující protein (uncoupling protein)
UDP	uridin difosfát
UKPDS	studie "The UK Prospective Diabetes Study"
VCAM-1	vaskulární adhezní molekula
vWF	von Willebrandův faktor
WHO	Světová zdravotnická organizace (World health organization)

## 5 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) stouplo 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 nediagnostikovaným 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).

Diabetes mellitus je onemocnění charakterizované poruchou regulace glukózové homeostázy v organizmu. Hlavním hormonem zodpovědným za tuto regulaci je inzulín produkovaný B buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu. Zatímco diabetes 1. typu je podmíněn nejčastěji autoimunitně podmíněnou destrukcí B buněk s následným absolutním nedostatkem inzulínu, pro diabetes 2. typu je charakteristická především inzulinová rezistence periferních tkání často doprovázená hyperinzulinemií, a teprve později se rozvíjející porucha pankreatické inzulinové sekrece. (Škrha J., 2009). Na druhou stranu ani v případě těžké hyperinzulinemie se diabetes nerozvine, pokud není přítomna genetická predispozice k selhání B buněk. Proto se v dnešní době začíná zdůrazňovat tzv. B buněčně-centrický model, který představuje minimálně 11 faktorů, které k selhání B buňky mohou přispívat, ale teprve její faktické selhání vede k rozvoji diabetu (Schwartz S. S. et al., 2016). Dochází tak k částečnému stírání rozdílů mezi diabetem 1. a 2. typu, což jenom odráží zkušenosti z praxe, kde občas nelze jasně rozhodnout, o jaký typ diabetu se jedná. Jistě existují i další méně časté typy diabetu, které však postihují jen malou část pacientů.

Nezávisle na typu diabetu jsou chronické diabetické komplikace podobné, jen se liší rychlosťí rozvoje, popř. závažností. 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).

## 6 Patogeneze diabetických cévních komplikací

Chronické diabetické komplikace souvisejí dominantně s rozvojem morfologických a funkčních změn v cévní stěně. Ta je postižena v celém rozsahu od kapilár a pre-/postkapilár až po velké arterie. Dle velikosti poškozené cévy se pak rozlišuje diabetická mikro- a makroangiopatie. Mikrovaskulární řečiště je nejčastěji poškozeno v ledvinách (diabetická nefropatie), na očním pozadí (diabetická retinopatie) a v dlouhých nervech (diabetická neuropatie). Makrovaskulární postižení se projevuje akcelerovanou aterosklerózou postihující nejčastěji koronární řečiště (pod obrazem ischemické choroby srdeční), mozkové tepny (s možným rozvojem cévní mozkové příhody) nebo tepny dolních končetin (pod obrazem ischemické choroby dolních končetin).

Hlavním patogenním faktorem v rozvoji diabetické mikroangiopatie je hyperglykémie. Zatímco většina buněk v těle reaguje na extracelulární hyperglykémii sníženým transportem glukózy do buňky, endotelové buňky toto protektivní snížení nevykazují, čímž dochází k intracelulární hyperglykémii (Kaiser N. et al., 1993). Je známo 5 základních biochemických mechanizmů, popisujících poškozování tkání zvýšenou hladinou glukózy:

### (1) Zvýšená aktivita polyolové dráhy

Polyolová dráha je založena na aktivitě aldóza reduktázy, která redukuje karbonylové sloučeniny na příslušné polyoly. Při zvýšené aktivitě aldóza reduktázy dochází k větší konzumaci kofaktoru NADPH, který je zároveň nezbytný k regeneraci redukovaného glutathionu, významného scavengeru reaktivních forem kyslíku (ROS), a tím stoupá intracelulární oxidační stres. V experimentálních podmínkách u myší bylo dokázáno, že zvýšená exprese aldóza reduktázy zhoršila aterosklerózu a snížila expresi genů regulujících regeneraci glutathionu (Vikramadithyan R. K. et al., 2005). Otázkou zůstává, co je vlastním substrátem reduktázy – místo původně předpokládané glukózy se dnes považují za hlavní substrát metabolismu glykolýzy, především glyceraldehyd 3-fosfát (Giacco F. and Brownlee M., 2010).

## **(2) Aktivace proteinkinázy C**

Proteinkináza C (PKC) je enzym fosforylující cílové proteiny v závislosti na přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a fosfatidylserinu. Její aktivita výrazně stoupá v přítomnosti diacylglycerolu (DAG). V terénu zvýšeného oxidačního stresu dochází intracelulárně k hromadění meziproduktů glykolýzy (viz dále) a mj. stoupá de novo syntéza DAG, což dlouhodobě aktivuje PKC. Podobně je PKC aktivována i vazbou konečných produktů glykace (AGEs) na receptor RAGE (viz dále). Chronická aktivace PKC vede k celé řadě patologických procesů – v endotelových buňkách je snížena produkce NO, resp. je inhibována inzulínem stimulovaná exprese eNOS (Ganz M. B. and Seftel A., 2000, Kuboki K. et al., 2000), zvyšuje se exprese VEGF zvyšujícího permeabilitu, PAI-1 inhibujícího fibrinolýzu či NF $\kappa$ B, který dále akceleruje chronickou zánětlivou odpověď (Feener E. P. et al., 1996, Yerneni K. K. V. et al., 1999).

## **(3) Zvýšená aktivita hexosaminové dráhy**

Hyperglykémie přispívá k zvýšenému vstupu fruktóza 6-fosfátu do hexosaminové dráhy, která z fruktózy 6-fosfátu přes glukosamin 6-fosfát generuje UDP-acetylglukosamin. Ten je nezbytný k posttranslační modifikaci některých proteinů, např. transkripčních faktorů. Je popsána zvýšená exprese genů pro PAI-1, TGF- $\alpha$  či TGF- $\beta$ 1 pod vlivem UDP-acetylglukosaminu (Du X. L. et al., 2000, Kolm-Litty V. et al., 1998).

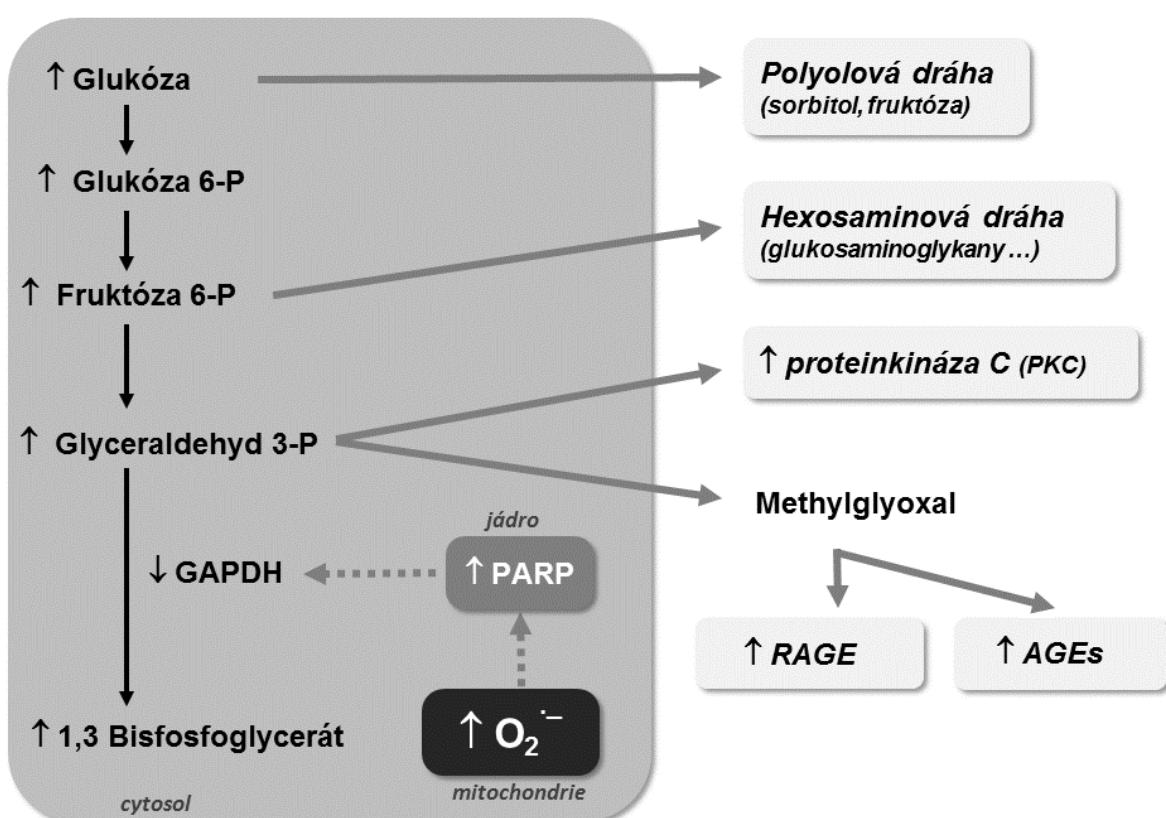
## **(4) Zvýšená intracelulární tvorba konečných produktů pokročilé glykace (AGEs)**

Akcelerovaná glykolýza generuje větší koncentraci jejích meziproduktů. Ty se pak často podílejí na glykaci intracelulárních struktur více než samotná glukóza. Jednou z nejsilnějších glykujících molekul je methylglyoxal.

## **(5) Zvýšená exprese receptoru pro AGEs (RAGE) a jeho aktivačních ligandů**

Aktivace receptoru pro AGEs (RAGE) vede mj. ke stimulaci pleiotropně působícího transkripčního faktoru NF $\kappa$ B, jenž dále ovlivňuje expresi mnoha genů uplatňujících se v chronické zánětlivé reakci organizmu. Aktivovaný RAGE se podílí nejen na progresi oxidačního stresu tím, že zvyšuje aktivitu NADPH oxidázy, ale také potlačuje protektivní efekt glyoxalázy 1.

Dle současných poznatků je pravděpodobné, že primární příčinou, vedoucí k rozvoji výše popsaných mechanizmů, je mitochondriální nadprodukce reaktivních forem kyslíku (ROS) (**obrázek 1**) (Brownlee M., 2005, Kayama Y. et al., 2015). Při hyperglykémii se zvyšuje intracelulární koncentrace glukózy, která je dominantně metabolizována glykolýzou na pyruvát. Akcelerovaný citrátový cyklus produkuje nadbytek elektronů (na NADH a FADH<sub>2</sub>) pro dýchací řetězec, stoupá protonový gradient na mitochondriální membráně a častěji dochází k „úniku“ elektronu a jeho reakci s molekulárním kyslíkem za vzniku superoxidového radikálu. Pokud je produkce superoxidového radikálu vyšší než kapacita protektivní superoxid dismutázy (SOD), dochází k nadměrné produkci ROS. Tuto teorii potvrzují experimenty dokládající, že vyrušením protonového gradientu „odpojovacím“ (uncoupling) proteinem UCP-1 nebo zvýšenou expresí MnSOD je zabráněno nadprodukci ROS a dalším komplikacím (Shen X. et al., 2006, Xie Z. L. et al., 2008).



**Obrázek 1:** Jednotící představa vlivu oxidačního stresu na hromadění meziproduktů glykolýzy a rozvoj 5 hlavních patobiochemických druh poškození tkání při diabetu. GAPDH – glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza, PARP – polymeráza poly(ADP-ribózy), RAGE – receptor konečných produktů pokročilé glykace, AGEs – konečné produkty pokročilé glykace

Klíčovým enzymem glykolýzy je glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH). Pokud je její aktivita snížená, dochází k hromadění meziproduktů glykolýzy před tímto enzymem a častějšímu vstupu této molekul do alternativních drah (viz výše). Je známo, že hyperglykémie snižuje aktivitu GAPDH. Podobný vliv však má také modifikace GAPDH ADP-ribózou (Du X. L. et al., 2003). V terénu zvýšeného oxidačního stresu dochází k častějšímu poškození jaderné DNA, což aktivuje jinak neaktivní reparační enzym polymerázu poly(ADP-ribózy) (PARP). Ta odštěpuje ADP-ribózu a její polymery připojuje na různé proteiny, mj. i na GAPDH, jejíž aktivita tímto klesá (Giacco F. and Brownlee M., 2010).

## 6.1 Oxidační stres

Zatímco v mikrocirkulaci je hlavní příčinou větší produkce ROS hyperglykémie, v rozvoji diabetické makroangiopatie hráje pravděpodobně hlavní úlohu v generování ROS zvýšená oxidace mastných kyselin (Giacco F. and Brownlee M., 2010).

Společně s peroxidem vodíku a oxidem dusnatým ( $\text{NO}^\bullet$ ) je superoxid hlavním ROS podílejícím se na vzniku dalších reaktivních kyslíkových forem. Obrana organizmu před těmito radikály zahrnuje 3 skupiny „antioxidační ochrany“:

1. malé molekuly ROS-scavengerů/antioxidantů (např. vitamin C, vitamin E, karotenoidy, glutathion, flavonoidy, ubiqinol, haptoglobin, hemopexin, kyselina močová, thioredoxin a další)
2. antioxidační systémy (kataláza, glutathionperoxidáza, transferin – ferritin, superoxiddismutáza a další)
3. reparační či degradační enzymy (proteázy, lipázy, DNAázky/RNAázky a jiné).

Pokud je v organizmu nadbytek ROS a/nebo nedostatečná „antioxidační ochrana“, rozvíjí se tzv. **oxidační stres**. Ten je příčinou mnoha různých patologických stavů nevyjímaje diabetické cévní komplikace. Je znám jeho významný podíl na rozvoji **endotelové dysfunkce**, tedy primárně funkční poruchy endotelu charakterizované zhoršením jeho vazodilatačních schopností spojených s prozánětlivou a protrombogenní aktivací. Endotelová dysfunkce je prediktivním ukazatelem diabetické mikroangiopatie a časné aterosklerózy (Bertoluci M. C. et al., 2015).

V posledních letech se navíc s příchodem nových klinických možností kontinuálního měření glykémie ukazuje, že tzv. **glykemická variabilita** (tedy oscilující hodnoty glykémií), indukuje vyšší oxidační zátěž a způsobuje větší poškození endotelu než pouze setrvalá hyperglykemie (Ceriello A. et al., 2008, Schisano B. et al., 2011), navíc ovlivňuje expresi celé řady proteinů uplatňujících se v ochraně před reaktivními metabolity, např. glyoxalázy I, superoxiddismutázy 2, RAGE či transketolázy (Kuricova K. et al., 2016). Její význam v rozvoji mikrovaskulárních i makrovaskulárních komplikací byl opakován prokázán (Saisho Y., 2014, Skrha J. et al., 2016, Soupal J. et al., 2014). Velký dopad má i přítomnost hypoglykémie – experimentálně navozená hypoglykémie po dobu 2 hodin zvýšila míru oxidačního stresu a zhoršila endotelovou funkci. Toto zhoršení bylo dokonce ještě větší, pokud hypoglykémie následovala po hyperglykémii (Ceriello A. et al., 2014).

Dlouho je znám vliv oxidačního stresu na rozvoj diabetických komplikací, v posledním desetiletí však byla potvrzena i jeho významná úloha v rozvoji dysfunkce B buněk a inzulinové rezistence, tedy základních faktorů v rozvoji samotného diabetu 2. typu (Leahy J. L., 2005).

Hodnocení oxidačního stresu není jednoduché a neexistují jasné standardy k jeho posuzování (Palmieri B. and Sblendorio V., 2007a). Na jedné straně lze stanovit přímo volné radikály pomocí ESR spektrometrie (Electron Spin Resonance), elektronové paramagnetické rezonance či magnetické rezonance. Dále jsou k dispozici metody posuzující lipoperoxidaci tkání – nejčastěji se používá stanovení koncentrace malondialdehydu (MDA). Hodnotit lze také míru poškození proteinů oxidačním stresem – buď měřit přímo zastoupení karbonylovaných proteinů, nebo změnu koncentrace reparačních mechanizmů, např. glutathionu. Experimentálně lze také hodnotit míru poškození DNA oxidačním stresem (Dizdaroglu M. et al., 2002). Konečně i stanovování antioxidačně působících látek (hemoxigenáza, kyselina močová, některé vitaminy) doplňují pohled na tuto komplexní problematiku.

V poslední dekádě se intenzivně rozšiřují možnosti ambulantního měření oxidačního stresu, resp. antioxidačního potenciálu z minimálního vzorku krve. Jde např. o komerční testy FORT (Free Oxygen Radicals Testing)/FORD (Free Oxygen Radical Defend) či dROMs (derivative Reactive Oxygen Metabolites)/BAP (Biological Antioxidant Potency) (Palmieri B. and Sblendorio V., 2007b).

## 6.2 Mikrovaskulární reaktivita

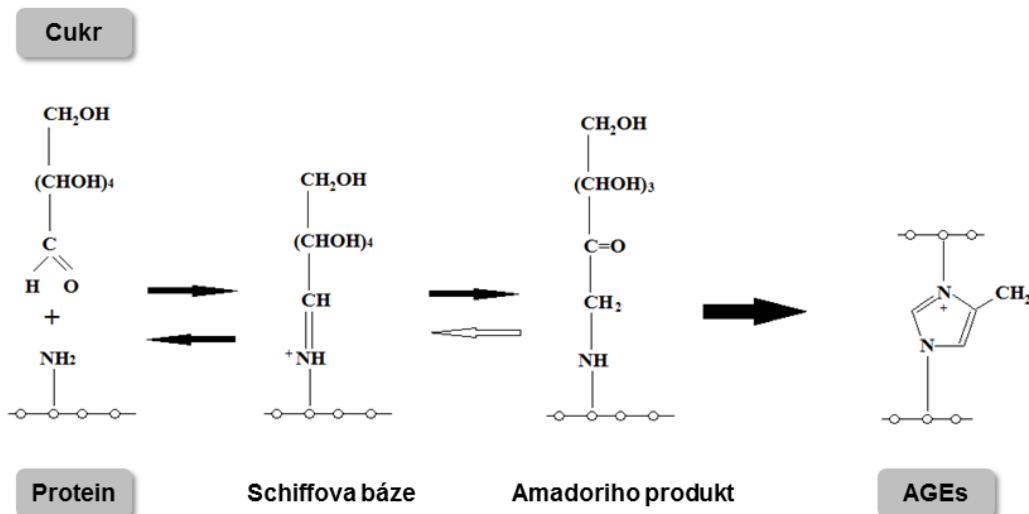
S biochemickými změnami při oxidačním stresu a následné endotelové dysfunkci je úzce spojeno funkční poškození mikrovaskulárního řečiště (Skrha J. et al., 2001). Zhoršení mikrovaskulární reaktivity bylo opakovaně pozorováno u pacientů s diabetem, často ještě bez rozvinutých klinických známek mikroangiopatie (Houben A. et al., 1992, Jorneskog G. et al., 1995). Navíc zejména u pacientů s diabetem 2. typu může být mikrovaskulární reaktivita zhoršená již v době diagnózy diabetu (Vinik A. I. et al., 2001). Zatímco je porušená mikrovaskulární reaktivita významným markerem rozvoje mikroangiopatie, dle současných poznatků ji nelze zcela aplikovat k predikci kardiovaskulárního onemocnění (Cekic E. G. et al., 2017, Flammer A. J. et al., 2012). K hodnocení mikrovaskulární reaktivity se v posledních dvou dekádách používalo více metod, v dnešní době však dominují neinvazivní techniky LSCI (Laser Speckle Contrast Imaging) nebo laser dopplerovská fluxmetrie (Cracowski J. L. and Roustit M., 2016).

## 6.3 Neenzymatická glykace

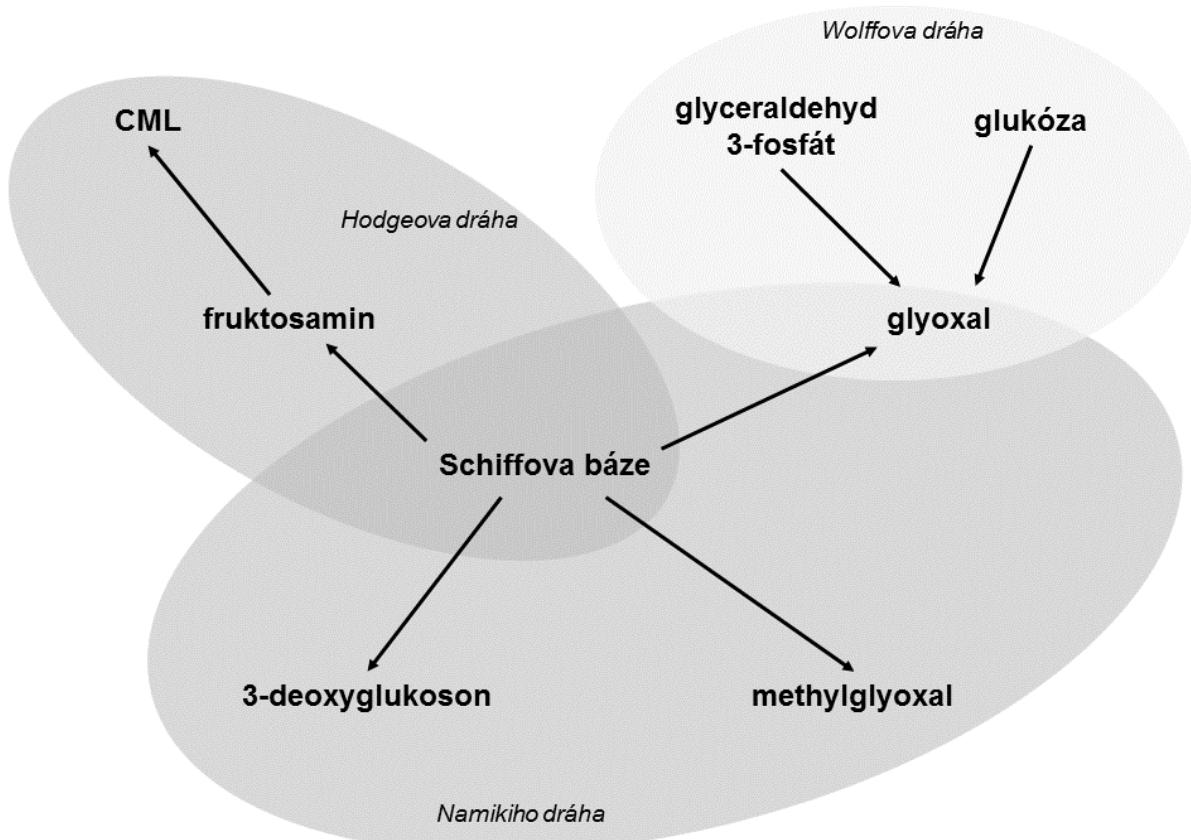
### 6.3.1 AGEs

Konečné produkty pokročilé glykace (AGEs) jsou velmi heterogenní skupinou molekul vznikající neenzymatickou glykací proteinů, lipidů či nukleových kyselin během tzv. Maillardovy reakce (obrázek 2) (Makita Z. et al., 1991, Vlassara H. and Striker G. E., 2013). Jedná se o několikastupňový proces, který zahrnuje vznik Schiffovy báze mezi karbonylovou skupinou redukujících cukrů a aminoskupinou proteinů, lipidů či nukleových kyselin. Následnou přestavbou vzniká tzv. Amadoriho produkt (Ahmed N., 2005).

Autooxidací Amadoriho produktu tzv. Hodgeovou dráhou v terénu zvýšené glykémie vznikají ireverzibilní AGEs. AGEs však vznikají i jinými dráhami – degradací lipidů a aminokyselin, odštěpení dikarbonylů z aldiminů (Namikiho dráha) či autoxidací monosacharidů glukózy, ribózy, fruktózy či glyceraldehydu (Wolffova dráha) (obrázek 3). (Ott C. et al., 2014). Některé metabolity glykolýzy či polyolové dráhy (fruktóza, dikarbonyly glyoxal a methylglyoxal či glyceraldehyd) jsou pak výrazně reaktivnějšími sloučeninami v tvorbě AGEs (Dornadula S. et al., 2015, Takeuchi M., 2016).



Obrázek 2: Maillardova reakce. AGEs – konečné produkty pokročilé glykace.



Obrázek 3: Vznik AGEs Hodgeovou, Namikiho a Wolffovou dráhou. CML – karboxymethyllysin.

Tyto glykační reakce probíhají relativně pomalu a za normálních okolností trvá vznik AGEs řádově měsíce. Poškozeny tak jsou nejčastěji proteiny s dlouhou životností, např. kolagen. Při vyšší teplotě, v terénu oxidačního stresu či hyperglykémie je však vznik AGEs výrazně urychlen, a glykace může postihnout i proteiny s krátkou životností, např. enzymy, či hormony.

AGEs se dle svých vlastností rozdělují do tří skupin:

- 1) fluorescenční „sítující“ (např. pentosidin),
- 2) nefluorescenční „sítující“ (např. deriváty glyoxalu a methylglyoxalu),
- 3) „nesítující“ (např. karboxymethyllysin CML) (Onorato J. M. et al., 1998, Stirban A. et al., 2014).

### **6.3.2 Původ AGEs a jejich osud v organizmu**

AGEs vyskytující se v organizmu jsou z větší části endogenního původu, ale část z nich pochází z exogenních zdrojů (Cai W. J. et al., 2012). Je známo, že tepelnou úpravou pokrmů stoupá množství AGEs v potravě (Uribarri J. et al., 2010). Z té se pak v trávicím traktu částečně resorbují do krevního řečiště, kterým cirkulují obdobně jako endogenní AGEs (Foerster A. and Henle T., 2003).

Výsledný efekt AGEs v organizmu probíhá dvěma základními mechanizmy (*obrázek 4*) – nezávisle na receptoru a prostřednictvím receptoru.

#### **1) Efekt AGEs nezávislý na receptoru**

Glykace proteinů či lipoproteinů mění jejich normální funkci. Poškozeny mohou být jak extracelulární struktury, tak intracelulární.

##### **a. Glykace v extracelulární matrix**

Hromadění AGEs v extracelulární matrix způsobuje „zesítování“ proteinů, což vede k snížené elasticitě a zvýšené cévní tuhosti, ztlušťování cév a zužování cévního lumen (McNulty M. et al., 2007). Interakce mezi AGEs a biologickými vazebnými místy extracelulárních proteinů omezuje jejich vazbu na substrát. Glykací kolagenu IV je tak například alterována vazba s endotelovými buňkami (Haitoglou C. S. et al., 1992). Naopak glykace LDL partikulí zvyšuje jejich patogenní úlohu v akceleraci

aterosklerózy, navíc glykací se snižuje protektivní role HDL (Aronson D. and Rayfield E. J., 2002). Některé glykované molekuly mají velký význam v diagnostice, popř. monitoraci úspěšnosti terapie diabetu. V tomto směru se nenahraditelným parametrem stala koncentrace glykovaného hemoglobinu HbA<sub>1c</sub>, tedy Amadoriho produktu, jehož koncentrace odráží průměrnou glykémii v posledních 2 až 3 měsících. Dlouhodobě je zkoumán i význam dalších molekul (glykovaný albumin, fruktosamin aj.), které se však v klinické diagnostice zatím spíše neujaly (Welsh K. J. et al., 2016).

### b. Intracelulární glykace

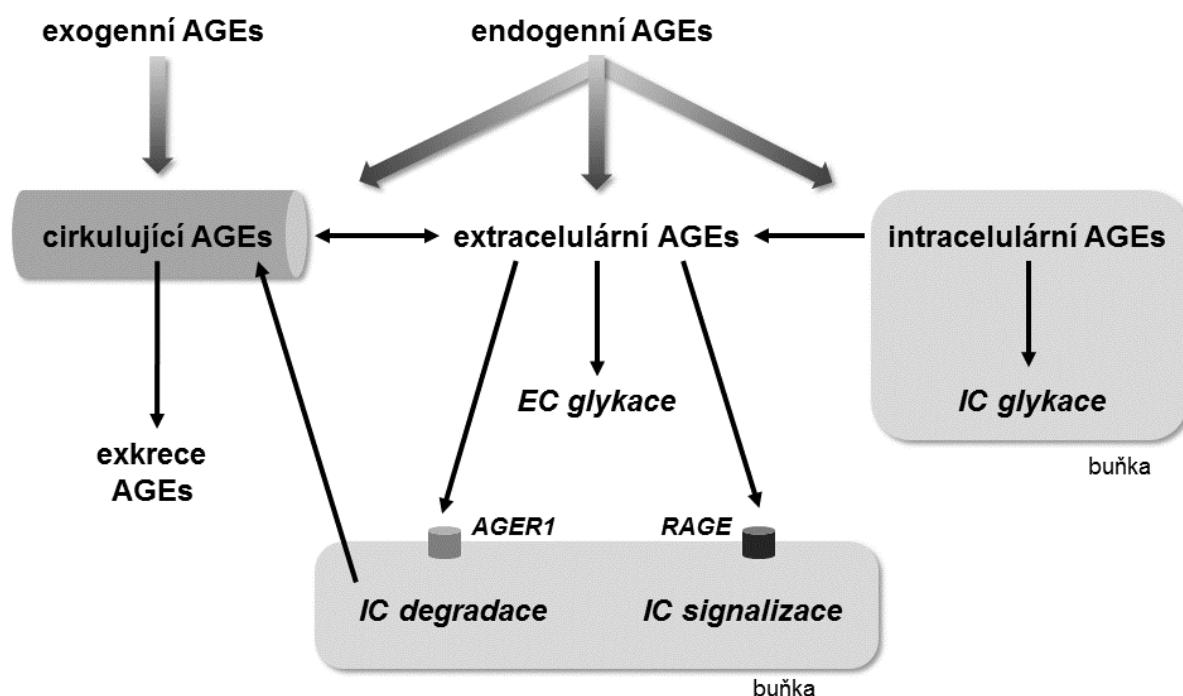
V buňkách se na glykaci více než samotná glukóza uplatňují reaktivní meziprodukty glykolýzy. Podílejí se na snížené expresi eNOS a inaktivaci NO, což zhoršuje vazodilatační schopnosti cévního řečiště (Soro-Paavonen A. et al., 2010). Modifikací mitochondriálních proteinů methylglyoxalem se zvýšila mitochondriální produkce superoxidu, což dále akcelerovalo oxidační stres (Rosca M. G. et al., 2005). Podobně methylglyoxal glykací zhoršuje funkci proteasomu (Queisser M. A. et al., 2010). Neméně významná je účast AGEs v samotné patogenezi diabetu. V posledních letech přibývá důkazů o tom, že konečné produkty glykace se podstatnou měrou podílejí na rozvoji inzulinové rezistence. Bylo popsáno několik mechanizmů a o celé řadě dalších se spekuluje. Glykace inzulínu vede k jeho nižší účinnosti v cílových tkáních (Boyd A. C. et al., 2000). Rovněž bylo prokázáno, že vyšší koncentrace methylglyoxalu modifikuje AMP kinázu, a tím zvyšuje inzulinovou rezistenci v játrech (Gugliucci A., 2009).

Recentně byla publikována zpráva, že zvýšené cirkulující AGEs mohou být spojeny s horší prognózou kriticky nemocných na jednotce intenzivní péče (Meertens J. H. et al., 2016), tedy jde o efekty velmi rychlé.

## 2) Efekt AGEs zprostředkováný receptorem

Receptorů vázajících AGEs je celá řada a vyskytují se na různých typech buněk, mj. na makrofázích, adipocytech, endoteliálních buňkách i hladkých svalových buňkách. Jejich exprese závisí na lokalizaci či typu buňky a je regulována změnami metabolismu např. během stárnutí, při diabetu či dyslipidémie (Ott C. et al., 2014). Nejvíce prozkoumaným je receptor RAGE, který je zodpovědný za většinu nežádoucích biologických účinků AGEs

v těle (Ohgami N. et al., 2001, Ramasamy R. et al., 2016, Rudijanto A., 2007). Mnohé další komplexy receptoru AGE-R s dalšími strukturami jsou schopny vázat AGEs (např. AGE-R1/OST-48, AGE-R2/80K-H, AGE-R3/galectin-3) (Li Y. M. et al., 1996, Vlassara H. et al., 1995), podobně jako některé scavengerové molekuly (SR-A; SR-B: CD36, SR-BI, SR-E: LOX-1; FEEL-1/FEEL-2) (Ohgami N. et al., 2002, Tamura Y. et al., 2003).



**Obrázek 4:** Exogenní a endogenní AGEs v organizmu. IC – intracelulární, EC – extracelulární, AGE-R1 a RAGE – receptory AGEs.

### 6.3.2.1 AGE-R

Receptorový komplex AGE-R má tři různé podtypy s odlišnou biologickou funkcí. Komplex AGE-R1/OST-48 se uplatňuje v transportu AGEs do endoplazmatického retikula a degradaci některých AGEs, navíc suprimuje expresi RAGE, což vede mj. k potlačení tvorby ROS. Naproti tomu není funkce komplexu AGE-R2/80K-H zcela zřejmá, pravděpodobně se podílí na buněčné signalizaci. Komplex AGE-R3/galectin-3 má vysokou afinitu k AGEs a podílí se na regulaci imunitní odpovědi, buněčné diferenciaci či migraci.

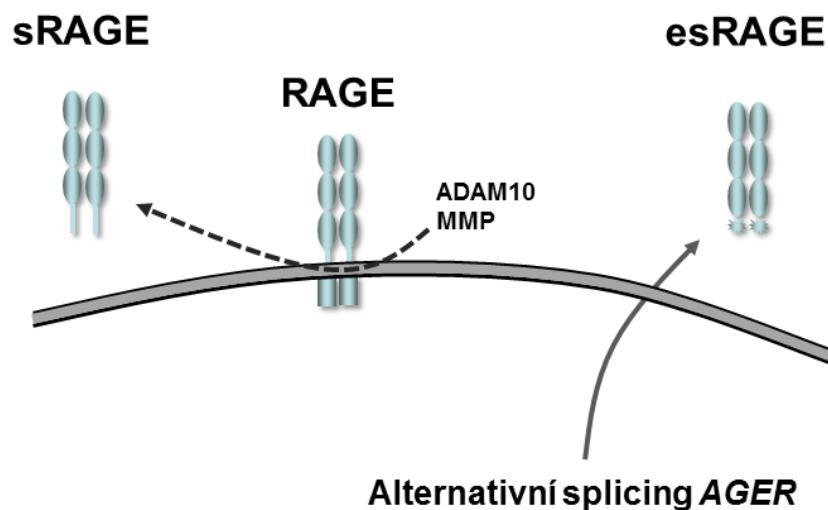
### 6.3.2.2 Scavengerové receptory

Skupina scavengerových receptorů je široká a značně heterogenní. Je však popsáno několik typů scavengerových receptorů, které mají schopnost vázat AGEs a podílet se pak na jejich degradaci – např. SR-A, CD36, SR-BI, LOX-1, FEEL-1/FEEL-2.

### 6.3.2.3 RAGE

Receptor pro konečné produkty pokročilé glykace (RAGE) byl poprvé popsán na povrchu endotelových buněk v roce 1992 (Neeper M. et al., 1992, Schmidt A. M. et al., 1992). Exprimován však je na nejrůznějších buňkách v těle, např. monocytech/makrofázích, T lymfocytech, dendritických buňkách, hladkých svalových buňkách, epitelu glomerulů, podocytech, kardiomyocytech, neuronech a dalších.

V organizmu se vyskytuje RAGE ve třech základních variantách (*obrázek 5*):



**Obrázek 5:** Tři varianty RAGE receptoru – kompletní receptor s extracelulární, transmembránovou i intracelulární částí, endogenně sekernovaný RAGE (esRAGE) a solubilní RAGE (sRAGE). ADAM10 – A Desintegrin And Metalloprotease 10, MMP – matrix metalloproteáza.

- 1) kompletní transmembránový receptor s extracelulární i intracelulární doménou,
- 2) endogenně sekernovaný RAGE (esRAGE), který vzniká alternativním sestřihem pre-mRNA transkriptů RAGE a následně je uvolněný do plazmy, obsahuje extracelulární, ale postrádá intracelulární doménu potřebnou k signální transdukci,
- 3) solubilní RAGE (sRAGE), který je odštěpen z kompletního transmembránového receptoru působením proteáz, např. matrix metaloproteáz (MMPs) či ADAM-10 (A Desintegrin And Metalloprotease Domain containing Protein 10). Tím podobně jako esRAGE má schopnost částečně „neutralizovat“ efekt RAGE ligandů, neboť jejich navázáním neaktivuje intracelulární děje. Reálný biologický efekt je však spíše malý (Katakami N. et al., 2008, Vazzana N. et al., 2009, Wautier J. L. and Grossin N., 2008, Yan S. F. et al., 2010).

#### *6.3.2.3.1 Ligandy RAGE*

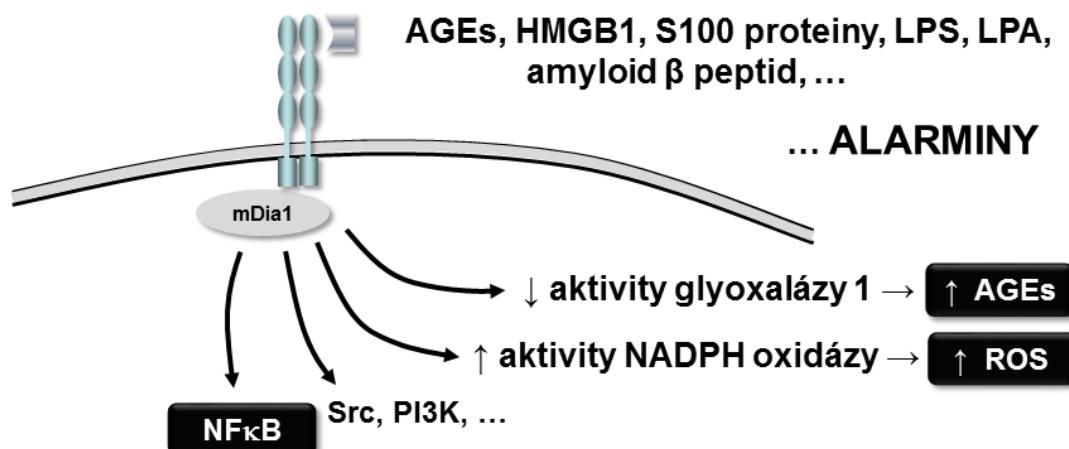
Kromě zmíněných AGEs se k RAGE receptoru váží (a často jsou potentnější než samotné AGEs) i jiné molekuly ze skupiny tzv. **alarminů**, např. proteiny S100/kalgranuliny, HMGB1 (high mobility group box-1), amyloid- $\beta$  peptid, lipopolysacharid, mac-1 či C1q (Ma W. et al., 2012, Yamamoto Y. et al., 2011, Yao D. and Brownlee M., 2010) či kyselina lysofosfositová (LPA) (Rai V. et al., 2012b). Alarminy se fyziologicky uplatňují v iniciaci akutního zánětu, ale jejich role byla opakováně popsána i v rozvoji chronické zánětlivé reakce, kterou pozorujeme například u aterosklerózy, tumorogeneze, neurodegenerativních onemocnění či diabetických cévních změn (Bierhaus A. and Nawroth P. P., 2009, Kosaki A. et al., 2004, Skrha Jr. J. et al., 2012, Yan S. F. et al., 2009). Konečně některé alarminy se indukcí inzulinové deficience v B buňkách a inzulinové rezistence periferních tkání podílejí na samotném rozvoji diabetu (Kim J. J. and Sears D. D., 2010, Lee B. W. et al., 2010, Wu H. et al., 2016).

#### *6.3.2.3.2 Aktivace RAGE*

Navázáním ligandu (alarminů či AGEs) na kompletní transmembránový RAGE dochází k aktivaci složité intracelulární kaskády dějů. Přesný mechanizmus aktivace zatím není detailně známý, ale je jisté, že hlavní roli hraje mDia1 – molekula ze skupiny forminů uplatňující se v následné buněčné signalizaci. Prostřednictvím proteinů rac-1 a cdc42 například ovlivňuje buněčnou migraci (Rai V. et al., 2012a). U gliomových buněk s knock-

down formou mDia-1 byla migrace indukovaná RAGE aktivací výrazně zeslabena (Hudson B. I. et al., 2008). Molekula mDia1 je zásadní k aktivaci src/JAK2/STAT3 kaskády ovlivňující proliferaci, zatímco vliv na p53/Bax kaskádu se uplatňuje v apoptóze buňky. Další molekuly (PI3K, PKC $\beta$ II, ERK a jiné) se podílejí na rozvoji zánětlivé odpovědi v buňce (Xie J. et al., 2013).

Následkem aktivace RAGE se zvyšuje aktivita NADPH oxidázy generující větší množství kyslíkových radikálů. Dochází k aktivaci NF- $\kappa$ B stimulujejícího chronickou zánětlivou odpověď organizmu, ale také k potlačení protektivních mechanizmů redukcí mRNA a transkriptů glyoxalázy I (**obrázek 6**) (Koulis C. et al., 2015, Reiniger N. et al., 2010, Wautier M. P. et al., 2001).



**Obrázek 6:** Intracelulární procesy spuštěné aktivací receptoru RAGE po navázání ligandu. AGES – konečné produkty pokročilé glykace, HMGB1 – High Mobility Group Box-1, LPS – lipopolysacharid, LPA, NF $\kappa$ B – nukleární faktor  $\kappa$ B, PI3K – fosfatidyl inositol 3-kináza, ROS – reaktivní formy kyslíku, Src – nereceptorová tyrosinkináza.

Velký zájem byl věnován RAGE polymorfismům a jejich vlivu na rozvoj diabetu či diabetických komplikací. Rozsáhlá meta-analýza s mnohatisícovými soubory osob však neprokázala asociaci mezi RAGE polymorfizmy rs1800625 (-429T/C), rs1800624 (-374T/A) či rs2070600 (557G/A, G82S) a rizikem rozvoje diabetu. Naopak byla

pozorována asociace mezi alelou 1704T a rizikem rozvoje diabetu a diabetické retinopatie, obzvláště v asijské populaci (Niu W. et al., 2012).

#### **6.3.2.4 Degradace AGEs**

Degradace AGEs proteinů spočívá v jejich intracelulární transformaci na solubilní AGEs peptidy (někdy nazývané „AGEs druhé generace“), které jsou pak opět uvolněny do cirkulace a následně vyloučeny močí. Významně se tak zde uplatňují AGEs vázající receptory, jež endocytózou transportují AGEs do buněk – hlavně AGE-R1/OST-48, AGE-R3/galectin-3 či scavengerové receptory SR-AII, SR-BI, CD36 (Miyazaki A. et al., 2002). Tyto procesy probíhají např. na tkáňových makrofázích, jaterních Kupferových buňkách či endotelu (Smedsrod B. et al., 1997, Stirban A. et al., 2014, Turk N. et al., 2004).

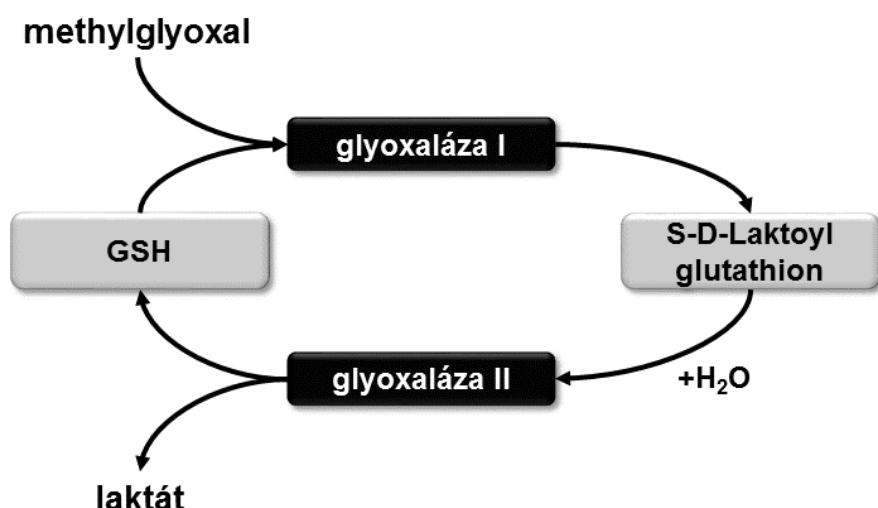
### **6.4 Deglykační mechanizmy**

Celková glykační zátěž organizmu je dána (ne)rovnováhou mezi proglykačními a deglykačními procesy. Pokud je deglykační ochrana nedostatečná, převažuje glykační zátěž spojená s výše uvedenými následky. Mezi hlavní deglykační mechanizmy patří fruktosamin 3-kinázový a glyoxalázový systém.

**Fruktosamin 3-kináza** (FN3K) je intracelulární enzym fosforylující fruktosamin za vzniku nestabilního fruktosamin 3-fosfátu, jenž se dále rozkládá na 3-deoxyglukoson a fosfát se současnou deglykací proteinů (Delpierre G. and Van Schaftingen E., 2003). Jeho zvýšená exprese byla pozorována v tkáních náchylných k vyšší glykaci, např. v čočce, srdci, nervech či ledvinách (Mohas M. et al., 2010). Doposud bylo popsáno několik polymorfismů FN3K majících vliv na aktivitu enzymu (Delpierre G. et al., 2006). Polymorfismus rs1056534 (900C/G) byl spojen s nižším glykovaným hemoglobinem a pozdějším nástupem diabetu 2. typu, avšak nebyla nalezena souvislost mezi tímto polymorfizmem a mikrovaskulárním postižením (Avemaria F. et al., 2015, Mohas M. et al., 2010). Jiná skupina však souvislost mezi uvedeným polymorfizmem a progresí diabetické nefropatie, resp. i kardiovaskulární morbidity, prokázala (Tanhäuserová V. et al., 2014).

**Glyoxalázový systém** zahrnuje glyoxalázu 1 a 2, které v přítomnosti glutathionu katalyzují konverzi  $\alpha$ -oxoaldehydů (zejména methylglyoxalu a glyoxalu) na laktát (*obrázek 7*).

Snížená aktivita glyoxalázy 1 (GLO1) v terénu oxidačního stresu ve vyšším věku vede k výraznější glykaci a poškození tkání (Song F. and Schmidt A. M., 2012). Deficit glyoxalázy 1 byl spojen s vyšším množstvím AGEs také u hemodialyzovaných pacientů (Miyata T. et al., 2001) a v experimentálních podmínkách byly u nedíabetických myší s redukovanou expresí *GLO1* dokonce pozorovány známky diabetické nefropatie (Giacco F. et al., 2014). Nejčastěji popisovaným polymorfizmem *GLO1* je rs4746 (419A/C), který byl spojen s redukovanou aktivitou enzymu GLO1, hromaděním methylglyoxalu a elevací RAGE u pacientů s autismem (Barua M. et al., 2011). U stejného polymorfizmu byly pozorovány u hemodialyzovaných pacientů vyšší hladiny sRAGE (Kalousova M. et al., 2008), zatímco u diabetiků tato asociace pozorována nebyla (Skrha Jr. J. et al., 2014).



*Obrázek 7: Glyoxalázový systém katalyzující přeměnu methylglyoxalu na laktát s recyklováním glutathionu (GSH).*

## 6.5 Metabolická paměť

Již v 80. letech minulého století bylo prokázáno, že hromadění AGEs v kůži souvisí u pacientů s diabetem 1. typu s přítomností mikro- a makrovaskulárních komplikací (Monnier V. M. et al., 1986). Později ukázala studie DCCT-EDIC, že glykace kolagenu v kůži předpovídá dlouhodobé diabetické komplikace i po adjustaci na glykovaný hemoglobin HbA<sub>1c</sub> (Genuth S. et al., 2005), a podobné výsledky přinesla i studie UKPDS u pacientů s diabetem 2. typu (Holman R. R. et al., 2008). Tím byly položeny základy teorie tzv. „glykemické“ popř. „metabolické paměti“. Oba pojmy jsou často považovány za

synonyma, byť některé zdroje více rozlišují glykemickou paměť jako vliv samotné glykémie na cévní komplikace a metabolickou paměť jako komplexní vliv různých metabolitů (glukóza, lipidy, glykační produkty atd.) na rozvoj chronických komplikací diabetu.

Starší diabetologické intervenční studie (DCCT-EDIC, UKPDS) ve své prolongované části ukázaly významné snížení mikrovaskulárních i makrovaskulárních komplikací u intenzivně léčených pacientů. Nedávno byla prezentována data, kde celková mortalita intenzivně léčených pacientů s diabetem 1. typu ve studii DCCT-EDIC byla dokonce nesignifikantně nižší než ve srovnatelné běžné populaci (Lachin J. M. et al., 2016). Naopak novější velké intervenční studie s diabetiky 2. typu (ACCORD, ADVANCE, VADT) (Duckworth W. et al., 2009, Gerstein H. C. et al., 2008, Patel A. et al., 2008) neprokázaly efekt intenzivnější léčby hyperglykémie na snížení makrovaskulárních komplikací a celkovou mortalitu. Zatímco prvně zmíněné studie se týkaly pacientů s nově manifestovaným diabetem, ty pozdější byly prováděny u pacientů s průměrným trváním diabetu 8 – 11 let.

Hlavní otázka tak zní, proč se rozvíjejí mikrovaskulární i makrovaskulární komplikace u pacientů s diabetem i po dosažení zcela uspokojivé hodnoty glykovaného hemoglobinu HbA<sub>1c</sub> a téměř normální, popř. úplně normální glykémie. Analogicky bylo zkoumáno, proč mají pacienti s diabetem, kteří byli na úplném počátku onemocnění intenzivněji léčeni, i po mnoha letech a často již s horší kompenzací diabetu lepší prognózu než pacienti zpočátku příliš neléčení. Detailní odpověď není ani dnes zcela jednoznačná, ale je jisté, že se uplatňují vlivy chronického zánětu, oxidačního stresu i epigenetických změn (Berezin A., 2016). Za epigenetické změny jsou považovány odchylky v aktivitě a expresi genů, při kterých není měněna nukleotidová sekvence. Vlivem hyperglykémie a chronického prooxidačního a prozánětlivého stavu však dochází k dysregulaci exprese genů, modifikaci histonů či některých miRNA, které pak mohou dále stimulovat chronickou zánětlivou odpověď organizmu (Zhao S. Z. et al., 2016). Většina těchto změn je trvalá a má tak škodlivé následky i po zlepšení kompenzace diabetu.

## 6.6 Možnosti detekce AGEs

Ke stanovování AGEs v organizmu existuje celá řada metod, jež se liší nejen specifitou pro určitý typ AGEs, ale i citlivostí či cenou. Rovněž je podstatné, zda jsou stanovovány rychlé změny koncentrací většinou cirkulujících AGEs, např. v rámci krátkých

intervenčních studií, nebo se jedná o dlouhotrvající epidemiologická sledování zaměřující se spíše na změny akumulace v tkáních vázaných AGEs.

### **6.6.1 Detekce v séru**

K detekci sérových koncentrací lze využít ELISA techniky, fluorescenční spektroskopii, kapalinovou chromatografií (HPLC) a metody na ní založené či hmotnostní spektrometrii (Ashraf J. M. et al., 2015, Stirban A. et al., 2014). Bohužel využití jednodušších ELISA technik i spektroskopických metod k detekci AGEs je značně problematické a v praxi se příliš neujalo.

### **6.6.2 Detekce ve tkáních**

Klasické stanovení ve tkáních vázaných AGEs vyžaduje obvykle invazivní přístupy, např. kožní biopsii. Přitom akumulace AGEs ve tkáních jistě odráží lépe dlouhodobou glykační zátěž organizmu než hladiny v krvi či moči. Proto byly vyvinuty neinvazivní techniky detekce využívající fluorescenční vlastnosti některých AGEs.

#### ***6.6.2.1 Autofluorescence kůže***

Zásadní role AGEs na formování „metabolické paměti“ byla opakováně potvrzena. V klinické praxi však jednoduché metody ke stanovení metabolické glykační zátěže dlouho nebyly k dispozici a rutinní provádění tkáňových biopsií bylo vyloučené. Až na počátku tohoto století byly ke stanovování kožní autofluorescence, která do značné míry odráží akumulaci AGEs v kůži, vyvinuty nové přístroje, jejichž využití se pro svoji neinvazivitu v následujících letech značně rozšířilo (Fokkens B. T. and Smit A. J., 2016). Neinvazivní měření kožní autofluorescence (skin autofluorescence, SAF) nedokáže stanovit veškeré typy AGEs v podkoží, ale bylo prokázáno, že zastoupení fluorescenčních AGEs silně koreluje s množstvím nefluorescenčních AGEs (Meerwaldt R. et al., 2004). Akumulace AGEs v podkoží je jiná než v cirkulaci. Zatímco kolagen v podkoží se obnovuje po 10 – 15 letech a po celou dobu své existence podléhá glykačním změnám, glykace hemoglobinu v cirkulaci probíhá 2 – 3 měsíce. To je také hlavní vysvětlení opakováně publikované nízké závislosti či nezávislosti parametrů kožní autofluorescence a HbA<sub>1c</sub> (Hartog J. W. L. et al., 2008, Skrha Jr. J. et al., 2013). Naopak, mnohokrát byl doložen vztah mezi kožní autofluorescencí a chronickými mikro- i makrovaskulárními komplikacemi diabetu (Gerrits E. G. et al., 2008, Lutgers H. L. et al., 2009, Noordzij M. J. et al., 2012).

Měření kožní autofluorescence je značně citlivé na přítomnost kožních krémů a tónovacích přípravků v místě měření, čímž může docházet ke zkresleným výsledkům. Podobně není

kožní autofluorescence vhodná k detekci AGEs u osob s tmavou pletí (třída V – VI dle Fitzpatricka) (Koetsier M. et al., 2010, Sachdeva S., 2009). Podrobnější popis měření kožní autofluorescence pomocí AGE Readeru je popsán v sekci použitých fyzikálních metod.

#### ***6.6.2.2 Autofluorescence oční čočky***

Oční čočka je orgán zajišťující lom světelných paprsků na sítnici. K úplné funkci musí být čočka elastická a plně transparentní, což zajišťuje komplikovaně organizované proteiny. Největší část proteinů čočky tvoří krystaliny, které jsou pomalu syntetizovány na periferii čočky a s postupujícím věkem se přesouvají do jejího centra, kde tvoří jádro. Tam se také vyskytují pravděpodobně nejdéle „žijící“ proteiny lidského těla. Na rozdíl od okolních struktur obsahuje čočka mladého jedince nižší koncentraci kyslíku i glukózy (Shui Y. B. and Beebe D. C., 2008, Tomana M. et al., 1984). V průběhu let však podléhá změnám, při kterých dochází ke kolorizaci a hromadění AGEs. Zatímco některé AGEs mají spíše souvislost s rozvojem stařecké katarakty, jiné AGEs se výrazně uplatňují v rozvoji diabetických změn (Nagaraj R. H. et al., 2012). Do druhé skupiny patří i v posledních letech hojně studovaný glucosepan, významný marker diabetické mikroangiopatie (Monnier V. M. et al., 2014).

Samotná autofluorescence čočky byla známa již v první polovině minulého století (Klang G., 1948, Vannas M W. A., 1938), ale až koncem 20. století bylo doloženo, že autofluorescence čočky (lens autofluorescence, LAF) stoupá s věkem a je výrazně vyšší u diabetiků (Bleeker J. C. et al., 1986). Zároveň autofluorescence úzce koreluje s celkovým množstvím všech stanovených AGEs v čočce (Abiko T. et al., 1999). Na rozdíl od SAF poskytuje autofluorescence čočky ještě dlouhodobější informaci o „celoživotní“ glykační zátěži organizmu.

## 7 Hypotéza a cíle práce

Patobiochemické změny u pacientů s diabetem jsou komplexní a zdaleka nesouvisí jen s izolovaně zvýšenou glykémií. 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 vtipované polymorfizmy genů ochranných deglykačních enzymů. Konečně byla otestována nová neinvazivní metoda stanovující 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 vtipovaných 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

## **8 Soubory pacientů a použité metody**

Dizertační práce obsahuje 3 studie, které se mírně liší jak souborem vyšetřených osob, tak použitými metodami. Níže jsou uvedeny základní charakteristiky jednotlivých souborů pacientů i hlavní použité metody. Ty jsou pak detailněji popsány v plných znění originálních publikací.

**Studie 1: RAGE a RAGE ligandy** – Relationship of Soluble RAGE and RAGE Ligands HMGB1 and EN-RAGE to Endothelial Dysfunction in Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus (*Příloha 1, strana 87*)

**Studie 2: Polymorfizmy FN3K a GLO1** – Fructosamine 3-Kinase and Glyoxalase I Polymorphisms and Their Association With Soluble RAGE and Adhesion Molecules in Diabetes (*Příloha 2, strana 92*)

**Studie 3: Kožní autofluorescence** – Skin Autofluorescence Relates to Soluble Receptor for Advanced Glycation End-Products and Albuminuria in Diabetes Mellitus (*Příloha 3, strana 101*)

### **8.1 Soubory pacientů**

Do studie byly zařazovány osoby s diabetem 1. a 2. typu s různě vyjádřenými mikro- a makrovaskulárními komplikacemi. Byly však vyloučeny pacienti s těžkým konkomitantním onemocněním (těžkým renálním poškozením, sekundární hypertenzí, neurodegenerativním onemocněním, známou malignitou či těžkou akutní infekcí).

Všechny studie byly provedeny v souladu s Helsinskou deklarací a byly schváleny Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice. Všechny osoby zařazené do těchto studií vyjádřily souhlas se svojí účastí ve studiích.

#### **8.1.1 Studie 1: RAGE a RAGE ligandy** (*Příloha 1*)

Do studie bylo zahrnuto 45 osob s diabetem 1. typu (22 mužů a 23 žen, medián věku 47 let) a 66 osob s diabetem 2. typu (46 mužů a 20 žen, medián věku 64 let). Všichni pacienti s diabetem 1. typu byli léčeni intenzifikovaným inzulinovým režimem, 30 pacientů s diabetem 2. typu bylo léčeno jen metforminem, 20 bylo léčeno kombinací perorálních

antidiabetik a inzulinu a zbývajících 16 jen inzulinem. Kontrolní skupinu tvořilo 43 osob (29 mužů a 14 žen, medián věku 56 let) srovnatelného stáří.

### **8.1.2 Studie 2: Polymorfizmy FN3K a GLO1** (Příloha 2)

Studie zahrnula celkem 595 osob (311 mužů a 284 žen), z čehož bylo 129 osob s diabetem 1. typu (medián věku 46 let), 340 osob s diabetem 2. typu (medián věku 63 let) a 126 zdravých kontrol (medián věku 45 let).

### **8.1.3 Studie 3: Kožní autofluorescence** (Příloha 3)

Bylo vyšetřeno 47 osob s diabetem 1. typu (27 mužů a 20 žen, medián věku 46 let) a 41 osob s diabetem 2. typu (25 mužů a 16 žen, medián věku 58 let). Všichni pacienti s diabetem 1. typu byli léčeni intenzifikovaným inzulinovým režimem, 20 pacientů s diabetem 2. typu bylo léčeno jen metforminem, 10 bylo léčeno kombinací perorálních antidiabetik a inzulinu a zbývajících 11 jen inzulinem. Kontrolní skupinu tvořilo 20 osob (5 mužů a 15 žen, medián věku 46 let) srovnatelného stáří.

## **8.2 Použité metody**

### **8.2.1 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 °C.

#### **8.2.1.1 sRAGE**

Sérové koncentrace solubilního RAGE (sRAGE) byly měřeny dle protokolu výrobce ELISA metodou (Quantikine, RD Systems, Minneapolis, MN, USA).

#### *8.2.1.1.1 Princip metody*

Tato imunoesej měří jak endogenně sekernovaný RAGE (esRAGE), který vzniká alternativním sestříhem pre-mRNA transkriptů RAGE a následně je uvolněný do plazmy, tak vlastní solubilní RAGE (sRAGE), který je odštěpen z kompletního transmembránového receptoru působením proteáz (Yonekura H. et al., 2003). Kvantitativní sendvičová enzymová imunoanalýza je založená na interakci mezi monoklonální protilátkou specifickou pro extracelulární doménu RAGE, jenž je navázána na nosiči, a RAGE ve vyšetřovaném vzorku. Po promytí jsou k vyšetřované směsi přidány specifické polyklonální protilátky proti RAGE s navázaným enzymem. Po přidání substrátu pro daný enzym vzniká fotometricky detekovatelná barva o intenzitě přímo úměrné koncentraci sRAGE.

#### *8.2.1.1.2 Reagencie*

- Mikrotitrační destičky s navázanou monoklonální protilátkou proti lidskému RAGE
- RAGE konjugát (polyklonální protilátku specifická proti lidskému RAGE konjugovaná s křenovou peroxidázou)
- RAGE standard (rekombinantní lidský RAGE)
- Ředící esej (Assay diluent) RD 1-60 (pufrovaná proteinová báze se stabilizátorem a modrým barvivem)
- Ředící roztok RD 6-10 (pufrovaná proteinová báze se stabilizátorem)
- Koncentrovaný promývací pufr
- Substrátový roztok A (stabilizovaný peroxid vodíku)
- Substrátový roztok B (stabilizovaný tetrametylbenzidin)
- Zastavovací roztok (2N kyselina sírová)

#### *8.2.1.1.3 Pracovní postup*

1. Všechny reagencie ponecháme při pokojové teplotě.
2. 20 ml koncentrovaného promývacího pufru přidáme k 480 ml destilované vody.
3. RAGE standard je nařídíme 1 ml destilované vody, čímž vznikne roztok s koncentrací 50 000 pg/ml. Následně pomocí ředícího roztoku RD 6-10 vytvoříme tyto koncentrace (5000, 2500, 1250, 625, 313, 156, 78 pg/ml), přičemž ředící roztok RD 6-10 slouží jako nulový standard.
4. 100 µl ředící eseje (Assay diluent) RD 1-60 napipetujeme do každé jamky.
5. Přidáme 50 µl vzorku resp. standardu do každé jamky a následně inkubujeme 2 hodiny při pokojové teplotě.

6. Poté každou jamku třikrát promyjeme 400 µl promývacího pufra a mikrotitrační destičku otočíme dnem vzhůru na čistý podklad.
7. 200 µl RAGE konjugátu přidáme do každé jamky a inkubujeme 2 hodiny při pokojové teplotě.
8. Opakujeme bod 6.
9. Substrátové roztoky A a B připravíme mícháním 15 minut před použitím.
10. Do každé jamky přidáme 200 µl substrátu a následně inkubujeme ve tmě po dobu 30 minut.
11. Do každé jamky přidáme 50 µl zastavovacího roztoku.
12. K měření absorbance použijeme spektrofotometr LabsystemsMultiscan RC, nastavený na 450 nm s korekcí na 540 nm. Koncentrace vzorku poté odečteme z kalibrační křivky.

### **8.2.1.2 EN-RAGE**

Sérové koncentrace EN-RAGE (Abnova, Taipei City, Taiwan) byly stanoveny rovněž ELISA metodou. Princip této kvantitativní sendvičové enzymové imunoanalýzy je analogický jako při stanovování sRAGE.

#### *8.2.1.2.1 Reagencie*

- EN-RAGE mikrotitrační destičky (polystyrenové mikrotitrační destičky s 96 jamkami potaženými monoklonální protilátkou proti S100A12/EN-RAGE)
- Promývací pufry
- Ředící pufry
- Humánní S100A12/EN-RAGE Standard
- HRP konjugát (detekční protilátka specifická proti lidskému S100A12/EN-RAGE konjugovaná s křenovou peroxidázou)
- Substrátové činidlo
- Zastavovací roztok

#### *8.2.1.2.2 Pracovní postup*

1. Všechny reagencie temperujeme na pokojovou teplotu.
2. 100 µl koncentrátu promývacího pufra je přidáme k 900 µl destilované vody.

3. Humánní S100A12/EN-RAGE standard je naředíme 1 ml destilované vody, čímž vznikne roztok s koncentrací 340 ng/ml, který slouží jako standard. Pomocí ředícího pufru poté vytvoříme následující koncentrace (5000, 2500, 1250, 625, 313, 156, 78 pg/ml) a samotný ředící pufr slouží jako nulový standard.
4. Jednotlivé vzorky naředíme 200x ředícím pufrem.
5. Do jamek napipetujeme 100 µl Standardních roztoků o výše uvedených koncentracích, resp. 100 µl naředěných vzorků či kontrol.
6. Následně destičku inkubujeme při pokojové teplotě 1 hodinu za soustavného třepání na třepačce.
7. Poté každou jamku čtyřikrát promyjeme 350 µl promývacího pufru.
8. 100 µl HRP konjugátu přidáme do každé jamky a inkubujeme na třepačce 1 hodinu při pokojové teplotě.
9. Následné promytí probíhá jako v bodě 7.
10. 100 µl substrátového činidla přidáme do každé jamky, inkubujeme 10 – 20 minut na třepačce při pokojové teplotě a chráníme před světlem.
11. Do každé jamky přidáme 100 µl zastavovacího roztoku.
12. K měření absorbance použijeme spektrofotometr LabsystemsMultiscan RC, nastavený na 450 nm s korekcí na 540 nm. Toto měření musí být provedeno do 30 minut od přidání zastavovacího činidla. Koncentrace vzorku se odečítá z kalibrační křivky a výsledek násobíme 200x.

### **8.2.1.3 HMGB1**

Sérové koncentrace HMGB1 (IBL, Hamburg, Německo) byly stanoveny rovněž ELISA metodou. Princip této kvantitativní sendvičové enzymové imunoanalyzy je analogický jako při stanovování sRAGE.

#### *8.2.1.3.1 Reagencie*

- HMGB1 mikrotitrační destičky (polystyrenové mikrotitrační destičky s 96 jamkami potaženými polyklonální protilátkou proti HMGB1)
- Promývací roztok
- Ředící pufr
- Humánní HMGB1 Standard a Pozitivní kontrola

- HMGB1 enzymový konjugát (monoklonální protilátká specifická proti HMGB1 konjugovaná s peroxidázou)
- Substrátové činidlo A a B
- Zastavovací roztok

#### *8.2.1.3.2 Pracovní postup*

1. 50 µl ředícího pufru je napipetujeme do všech jamek na mikrotitrační destičce.
2. Do příslušných jamek napipetujeme 50 µl standardů (koncentrace 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,313 ng/ml), „blanku“, pozitivních kontrol a vzorků.
3. Zakrytou destičku protřepeme a inkubujeme 20 – 24 hodin při 37 °C.
4. Následně destičku 5x promyjeme 400 µl promývacího pufru.
5. Do každé jamky přidáme 100 µl enzymového konjugátu a destičku inkubujeme 2 hodiny při 25 °C.
6. Následně opakujeme bod 4.
7. Do jednotlivých jamek přidáme 100 µl substrátového roztoku. Celou destičku inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě a chráníme před světlem.
8. Poté se do jednotlivých jamek přidáme 100 µl zastavovacího roztoku.
9. Absorbanci měříme spektrofotometrem LabsystemsMultiscan RC, nastaveným na 450 nm s korekcí na 540 nm, nejpozději do 60 minut od aplikace zastavovacího roztoku. Koncentraci vzorku odečteme z kalibrační křivky.

#### *8.2.1.4 Adhezní molekuly*

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). Principy metod jsou obdobné jako u výše uvedené metody ELISA pro sRAGE.

### **8.2.1.5 Rutinní metody**

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  $ACR > 3$  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 doporučované 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 ÚLB LD 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 analyzátem Super GLAmbulance (Dr. Müller Gerätebau, Freital, Německo) a glykovaný hemoglobin HbA<sub>1c</sub> na HPLC Variant II (Biorad, Francie).

## **8.2.2 Molekulárně-genetické metody**

### **8.2.2.1 Izolace DNA**

U vyšetřovaných osob byla DNA izolována z lymfocytů periferní krve standardní vysolovací metodou (Miller S. A. et al., 1988). Metoda je založena na rozpadu membrán erytrocytů v přítomnosti lyzačního pufru SLB (Salmiak Lysing Buffer). Za přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS) a proteinkinázy K dochází k lysisu jaderných buněk. Nasyceným roztokem chloridu sodného (NaCl) jsou pak vysoleny zbývající peptidy.

#### **8.2.2.1.1 Pracovní postup**

1. Vzorek krve (7 ml, EDTA) smícháme s cca 40 ml chlazeného 10x ředěného SLB pufru a celou zkumavku umístíme do drceného ledu. Za občasného otočení zkumavky inkubujeme při 0 °C po dobu 30 minut. Poté centrifugujeme při 3000 rpm,

30 minut, při teplotě 10 °C. Následně opatrně odstraníme supernatant, znovu přidáme 40 ml SLB pufru a umístíme na 20 minut do ledu. Poté opět centrifugujeme za stejných podmínek.

2. Po vylití supernatantu získaný červený pelet omyjeme 30 ml TK-1 pufru (KCl, TRIS, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, EDTA, HCl), důkladně zamícháme a centrifugací (3 000 rpm, 20 minut, při teplotě 10 °C) odstraníme erytrocytární membrány. Tento krok třikrát opakujeme, dokud nezískáme zcela bílý sediment krevních jaderných buněk.
3. Čistý leukocytární pelet resuspendujeme ve 3 ml lyzačního pufru pro jaderné membrány a dobře protřepeme. Dále přidáme 600 µl roztoku proteinkinázy K a 200 µl 10 % SDS, opatrně promícháme a inkubujeme při 37 °C do druhého dne.
4. Přidáme 1 ml 6 M NaCl a protřepeme. Vzniklý precipitát odstraníme centrifugací, 6000 rpm, 30 minut, při laboratorní teplotě.
5. Čirý supernatant přeneseme do nové zkumavky, přidáme nejméně trojnásobné množství chlazeného (-20 °C) 96 % ethanolu, opatrným obrácením se vysráží DNA (bílé želatinózní vlákno nebo chomáčkovitá sraženina).
6. Sraženinu DNA nabalíme na sterilní skleněný háček, omyjeme chlazeným (-20 °C) 70 % ethanolem a necháme oschnout na vzduchu.
7. Skleněný háček vložíme do sterilní kryozkumavky s 1000 µl TE pufru (TRIS + EDTA). Uvolněnou DNA necháme rozpouštět při laboratorní teplotě alespoň do druhého dne.

### **8.2.2.2 Měření koncentrace DNA**

Koncentrace izolované DNA byla měřena spektrofotometrem ND-1000 (NanoDrop). Po napipetování 1 – 2 ml vzorku DNA na konec dolního optického vlákna dojde ke spojení s horním optickým vláknem a vzniká sloupec tekutiny, ve kterém dochází k proměření absorbance prostřednictvím CCD (charge-coupled device) pole.

### **8.2.2.3 Polymorfizmus genu glyoxalázy 1 *GLO1 rs4746 (Glu111Ala, 419A/C)***

Gen *GLO1* se nachází na chromozomu 6p21.2. V případě polymorfizmu rs4746 je wild type alela A nahrazena mutovanou alelou C. Polymorfizmus byl stanoven metodou PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment lenght polymorphism analysis) dle popsaného postupu (Germanova A. et al., 2009, Kalousova M. et al., 2008). Restrikční

analýza využívá specifické restriktázy štěpící DNA. Přítomnost polymorfizmu ovlivní možnost konkrétní restrikce, čímž vznikají různě dlouhé amplifikované fragmenty DNA.

Samotná restrikce probíhala při teplotě 37 °C přes noc pomocí restrikční nukleázy BsmAI. Po digesci vznikaly fragmenty o délce 143 bp a 60 bp pro wild type alelu 419 A a 203 bp pro mutovanou alelu C. Vzniklé fragmenty byly následně separovány dle velikosti pomocí agarové elektroforézy, vizualizovány přidaným ethidium bromidem.

#### **8.2.2.4 Polymorfizmy genu fruktosamin 3-kinázy rs1056534 (S300S) a rs3848403 (intronová varianta C/T)**

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. Využité jsou dvojitě barvené hydrolyzační sondy, které nesou na 5' konci reportérový fluorofor a na 3' konci molekulu zhášeče. Během PCR dochází k hydrolýze této sondy, následně k separaci zhášeče a tím emisi fluorescence, která je detekována.

### **8.2.3 Fyzikální metody**

#### **8.2.3.1 Kožní autofluorescence**

Kožní autofluorescence (skin autofluorescence, SAF) byla měřena opakováně 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. Hodnota autofluorescence je uváděna v arbitrárních jednotkách a vypočtena jako podíl průměrné intenzity emitovaného světla na 1 nm o vlnové délce 420 – 660 nm a průměrné hodnoty intenzity excitovaného světla o vlnové délce 300 – 420 nm. Intraindividuální Altmanova odchylka je 5,0 % v jednom dni a 5,9 % při sezónních změnách (Meerwaldt R. et al., 2004).

### ***8.2.3.2 Autofluorescence oční čočky***

K měření autofluorescence oční čočky (LAF) byl využit biomikroskop ClearPath DS-120 (Freedom Meditech, San Diego, USA), který neinvazivně stanovuje autofluorescenci levé oční čočky. Během několika vteřin přístroj osvítí čočku modrým světlem a měří fluorescenční zelené světlo a zároveň rozptýlené modré světlo. Softwarově je pak vypočten poměr autofluorescence čočky k rozptýlenému světlu v centrální části oční čočky, který podává informaci o množství akumulovaných AGEs. Čím vyšší tento poměr je, tím je obsah AGEs v čočce vyšší (Burd J. et al., 2012).

### **8.3 Statistická analýza**

Výsledky biochemických parametrů jsou vyjádřeny jako průměr a směrodatná odchylka (SD), popř. průměr a mezikvartilové rozpětí (IQR, interquartile range) u logaritmovaných dat. Rozdíly mezi skupinami byly vyhodnoceny jednocestnou variační analýzou (ANOVA) s LSD nebo Bonferroniho post hoc testy. Korelace byly stanoveny pomocí Pearsonova nebo Spearmanova koeficientu dle rozložení hodnot. Lineární regresní analýza byla provedena k vyhodnocení nezávislých asociací proměnných. Pro testování Hardy-Weinbergova ekvilibria (HWE) byl použit  $\chi^2$  test. Statistická analýza byla provedena v programu Statistica 12 (StatSoft) a za statisticky významné byly považovány výsledky  $p<0,05$ .

## 9 Výsledky

Následující podkapitoly uvádějí hlavní výsledky jednotlivých zařazených publikací, jejich plné znění je k dispozici v korespondujících přílohách dále.

### 9.1 Studie 1: RAGE a RAGE ligandy (Příloha 1)

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],  $88 \pm 32 \text{ }\mu\text{g/l}$  [kontroly],  $p < 0,0005$ ; **VCAM-1**:  $915 \pm 450$  [DM1],  $848 \pm 342$  [DM2],  $365 \pm 70 \text{ }\mu\text{g/l}$  [kontroly],  $p < 0,0001$ ) i ligand RAGE receptoru **EN-RAGE** ( $250 \pm 197$  [DM1],  $292 \pm 207$  [DM2],  $109 \pm 66 \text{ }\mu\text{g/l}$  [kontroly],  $p < 0,0001$ ), resp. proteáza **MMP2** ( $287 \pm 108$  [DM1],  $318 \pm 118$  [DM2],  $190 \pm 31 \text{ }\mu\text{g/l}$  [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],  $1,60 \pm 0,96 \text{ }\mu\text{g/l}$  [kontroly],  $p < 0,02$ ).

Koncentrace **sRAGE** byla významně vyšší u diabetu 1. typu ( $1137 \pm 532$  [DM1],  $995 \pm 519$  [DM2],  $824 \pm 309 \text{ }\mu\text{g/l}$  [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. Detailní výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

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.

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

	<b>DM1 (n=45)</b>	<b>DM2 (n=66)</b>	<b>Kontroly (n=43)</b>	<b>ANOVA p</b>
<b>sRAGE (ng/l)</b>	1137±532 <sup>b</sup>	995±519	824±309	0,011
<b>HMGB1 (μg/l)</b>	2.23±1.65	2.59±1.96 <sup>b</sup>	1.60±0.96	0,011
<b>EN-RAGE (μg/l)</b>	250±197 <sup>c</sup>	292±207 <sup>c</sup>	109±66	<0,0001
<b>vWF (μg/l)</b>	114±48 <sup>a</sup>	127±56 <sup>c</sup>	88±32	0,0004
<b>MMP2 (μg/l)</b>	287±108 <sup>c</sup>	318±118 <sup>c</sup>	190±31	<0,0001
<b>MMP9 (μg/l)</b>	505±429	476±427	609±271	ns
<b>ICAM-1 (μg/l)</b>	260±84	296±176 <sup>b</sup>	206±64	0,002
<b>VCAM-1 (μg/l)</b>	915±450 <sup>c</sup>	848±342 <sup>c</sup>	365±70	<0,0001
<b>P-selektin (μg/l)</b>	113±34 <sup>a</sup>	116±41	140±76	0,028
<b>E-selektin (μg/l)</b>	29±14 <sup>bx</sup>	40±16	40±19	0,001

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<0,05, <sup>b</sup>p<0,01, <sup>c</sup>p<0,001; resp. mezi diabetiky 1. a 2. typu: <sup>x</sup>p<0,01.

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.

## 9.2 Studie 2: Polymorfizmy FN3K a GLO1 (Příloha 2)

Podrobná klinická charakteristika vyšetřovaných osob i přítomnost mikrovaskulárních a makrovaskulárních komplikací je uvedena v originálním článku v příloze. Kompenzace diabetu se mezi osobami s diabetem 1. a 2. typu významně nelišila (glykémie nalačno:  $8,7 \pm 3,6$  vs.  $8,7 \pm 3,3$  mmol/l, ns; HbA<sub>1c</sub>:  $69 \pm 14$  vs.  $64 \pm 21$  mmol/mol, ns), třebaže trvání diabetu 1. typu bylo delší než v případě diabetu 2. typu (16 vs. 11 let, p<0,001).

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) (tabulka 2). Rozdíly nebyly patrný ani při rozdělení pacientů dle absence či přítomnosti chronických mikrovaskulárních (nefropatie, neuropatie, retinopatie) a makrovaskulárních (ischemická choroba srdeční, ischemická choroba dolních končetin, iktus) komplikací.

**Tabulka 2:** Genotypové a alelické frekvence u osob s DM1, DM2 a kontrol.

			<b>DM1</b> (n=129)	<b>DM2</b> (n=340)	<b>Kontroly</b> (n=126)	$\chi^2$ test
<b>FN3K</b> (rs1056534)	Alely (%)	C	36	34	40	ns
		G	64	66	60	
	Genotypy (%)	CC	15	13	20	ns
		GG	44	44	41	
		CG	41	43	39	
<b>FN3K</b> (rs3848403)	Alely (%)	C	44	46	47	ns
		T	56	54	53	
	Genotypy (%)	CC	18	21	27	ns
		TT	29	30	32	
		CT	53	49	41	
<b>GLO1</b> (rs4746)	Alely (%)	C	46	49	48	ns
		A	54	51	52	
	Genotypy (%)	AA	32	28	32	ns
		CC	24	27	28	
		AC	44	45	41	

Byly pozorovány významně nižší koncentrace sRAGE u diabetiků s polymorfizmem *FN3K* rs1056534 a naopak vyšší koncentrace sRAGE u polymorfizmu *FN3K* rs3848403 (tabulka 3). Zatímco GG a CG genotypy *FN3K* rs1056534 s mutovanou G alelou byly asociovány s významných poklesem sRAGE (GG:  $1055 \pm 458$  a CG:  $983 \pm 363$  vs. CC:  $1796 \pm 987$  ng/l;  $p<0,0001$ ), u *FN3K* rs3848403 polymorfizmu byl TT genotyp s mutovanou T alelou spojen s významně vyšší koncentrací sRAGE (TT:  $1365 \pm 852$  vs. CT:  $1016 \pm 401$  a CC:  $1087 \pm 508$  ng/l;  $p=0,05$ ).

**Tabulka 3:** Koncentrace sRAGE u osob s diabetem a bez diabetu dle genotypu

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

Polymorfizmus *GLO1* rs4746 nebyl asociován s koncentrací sRAGE. Naopak byla pozorována souvislost tohoto polymorfizmu s koncentracemi adhezních molekul odrážejících endotelovou dysfunkci (tabulka 4).

**Tabulka 4:** Koncentrace adhezních molekul dle genotypu GLO1 (rs4746).

<b>GLO1</b> <b>(rs4746)</b>		<b>DM1</b> <b>(n=50)</b>		<i>ANOVA</i>	
		<b>AA</b>	<b>CC</b>	<b>AC</b>	
<b>ICAM-1</b> ( $\mu\text{g/l}$ )		279 $\pm$ 65	223 $\pm$ 47	213 $\pm$ 56	<b>p&lt;0,005</b>
<b>VCAM-1</b> ( $\mu\text{g/l}$ )		884 $\pm$ 308	839 $\pm$ 298	849 $\pm$ 237	ns
<b>P-selektein</b> ( $\mu\text{g/l}$ )		114 $\pm$ 41	78 $\pm$ 33	85 $\pm$ 39	<b>p&lt;0,05</b>
<b>E-selektein</b> ( $\mu\text{g/l}$ )		29 $\pm$ 11	24 $\pm$ 13	32 $\pm$ 13	ns

		<b>DM2</b> <b>(n=52)</b>		<i>ANOVA</i>	
		<b>AA</b>	<b>CC</b>	<b>AC</b>	
<b>ICAM-1</b> ( $\mu\text{g/l}$ )		281 $\pm$ 57	271 $\pm$ 102	274 $\pm$ 95	ns
<b>VCAM-1</b> ( $\mu\text{g/l}$ )		719 $\pm$ 314	1219 $\pm$ 426	927 $\pm$ 296	<b>p&lt;0,01</b>
<b>P-selektein</b> ( $\mu\text{g/l}$ )		114 $\pm$ 48	109 $\pm$ 46	110 $\pm$ 45	ns
<b>E-selektein</b> ( $\mu\text{g/l}$ )		51 $\pm$ 10	40 $\pm$ 25	34 $\pm$ 12	<b>p&lt;0,05</b>

### 9.3 Studie 3: Kožní autofluorescence (Příloha 3)

Detailní klinická a biochemická charakteristika vyšetřovaných osob je uvedena v originálním článku v příloze. Kompenzace diabetu se mezi osobami s diabetem 1. a 2. typu významně nelišila ( $HbA_1c$   $74 \pm 14$  vs.  $71 \pm 21$  mmol/mol, ns). Kožní autofluorescence (SAF), sRAGE a markery endotelové aktivace/dysfunkce v jednotlivých skupinách jsou uvedeny v tabulce 5. 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.

**Tabulka 5:** Kožní autofluorescence, sRAGE a markery endotelové aktivace/dysfunkce

	<b>DM1 (n=47)</b>	<b>DM2 (n=41)</b>	<b>Kontroly (n=20)</b>	<b>ANOVA p</b>
<b>SAF (AU)</b>	$2,39 \pm 0,54^b$	$2,63 \pm 0,73^c$	$1,96 \pm 0,33$	<b>&lt;0,0001</b>
<b>sRAGE (ng/l)</b>	$1250 \pm 627$	$1040 \pm 567$	$1163 \pm 537$	0,26
<b>vWF (%)</b>	$114 \pm 48$	$127 \pm 56^a$	$93 \pm 25$	<b>0,038</b>
<b>ICAM-1 (μg/l)</b>	$269 \pm 89$	$266 \pm 79$	$223 \pm 82$	0,10
<b>VCAM-1 (μg/l)</b>	$907 \pm 498^c$	$816 \pm 271^c$	$392 \pm 91$	<b>&lt;0,0001</b>
<b>P-selektin (μg/l)</b>	$113 \pm 36^b$	$101 \pm 35^c$	$145 \pm 52$	<b>0,0004</b>
<b>E-selektin (μg/l)</b>	$29 \pm 16^a$	$36 \pm 16$	$41 \pm 15$	<b>0,011</b>

Výsledky jsou uvedeny jako průměr $\pm$ SD. Byla provedena jednocestná ANOVA s LSD post-hoc testy mezi pacienty s diabetem a kontrolami:  $^a p<0,05$ ,  $^b p<0,01$ ,  $^c p<0,001$ .

AU, arbitrární jednotky; ICAM-1, intercelulární adhezní molekula; sRAGE, solubilní receptor konečných produktů pokročilé glykace; SAF, kožní autofluorescence; VCAM-1, vaskulární adhezní molekula; vWF, von Willebrandův faktor.

Pro další analýzy byly osoby s oběma typy diabetu posuzovány dohromady, a naopak rozděleny dle (ne)přítomnosti albuminurie (tabulka 6). U diabetiků s pozitivní albuminurií (A+) byla pozorována významně vyšší kožní autofluorescence i sRAGE oproti osobám bez albuminurie (A-).

**Tabulka 6:** Kožní autofluorescence a další parametry v podskupinách dle nepřítomnosti (A-) či přítomnosti (A+) albuminurie.

	A+ (n=19)	A- (n=69)	Kontroly (n=20)	ANOVA p
<b>SAF (AU)</b>	2,84 ± 0,80 <sup>cx</sup>	2,41 ± 0,56 <sup>b</sup>	1,96 ± 0,33	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Albumin/kreatinin (g/mol)</b>	13,2 <sup>cz</sup> (3,9-44,0)	0,7 (0,3-1,6)	0,5 (0,2-1,1)	<b>&lt;0,0001</b>
<b>HbA<sub>1c</sub> (mmol/mol, IFCC)</b>	90 ± 18 <sup>cz</sup>	68 ± 14 <sup>c</sup>	39 ± 5	<b>&lt;0,0001</b>
<b>sRAGE (ng/l)</b>	1457 ± 754 <sup>x</sup>	1066 ± 532	1163 ± 537	<b>&lt;0,05</b>
<b>vWF (%)</b>	137 ± 47 <sup>b</sup>	114 ± 45	93 ± 25	<b>0,007</b>
<b>ICAM-1 (μg/l)</b>	324 ± 102 <sup>cy</sup>	251 ± 70	223 ± 82	<b>0,0003</b>
<b>VCAM-1 (μg/l)</b>	965 ± 408 <sup>c</sup>	832 ± 400 <sup>c</sup>	392 ± 91	<b>&lt;0,0001</b>
<b>P-selektin (μg/l)</b>	102 ± 33 <sup>b</sup>	109 ± 37 <sup>b</sup>	145 ± 52	<b>0,0008</b>
<b>E-selektin (μg/l)</b>	39 ± 18	31 ± 15 <sup>a</sup>	41 ± 15	<b>0,016</b>

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<0,05, <sup>b</sup>p<0,01, <sup>c</sup>p<0,001 a mezi A+ a A-: <sup>x</sup>p<0,05, <sup>y</sup>p<0,01, <sup>z</sup>p<0,001.

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.

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 ± 0,55 vs. 2,27 ± 0,52 AU, p<0,02, u **ICAM-1** 2,91 ± 0,48 vs. 2,31 ± 0,50 AU, p<0,001, a u **VCAM-1** 2,61 ± 0,63 vs. 2,30 ± 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 ( $r = -0,48$ ,  $p < 0,001$ ;  $r = -0,30$ ,  $p = 0,05$ ).

Další pozorované korelace ukazuje tabulka 7. 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 ( $\beta = 0,55$ ;  $p < 0,03$ ;  $R^2 = 0,62$ ).

**Tabulka 7:** Korelační analýza mezi kožní autofluorescencí a dalšími parametry

	Kožní autofluorescence		
	DM1	DM2	Kontroly
<b>Trvání diabetu</b>	0,25 (ns)	<b>0,38</b> (0,01)	-
<b>Věk</b>	<b>0,53</b> (0,0001)	0,22 (ns)	<b>0,73</b> (0,0004)
<b>HbA<sub>1c</sub></b>	0,22 (ns)	<b>0,41</b> (0,007)	0,33 (ns)
<b>sRAGE</b>	<b>0,37</b> (0,02)	<b>0,60</b> (0,00003)	0,29 (ns)
<b>ICAM-1</b>	<b>0,61</b> (0,0007)	0,16 (ns)	0,37 (ns)
<b>vWF</b>	<b>0,52</b> (0,005)	0,28 (ns)	<b>0,63</b> (0,004)
<b>Kreatinin</b>	<b>0,34</b> (0,02)	0,25 (ns)	-0,28 (ns)
<b>ACR</b>	<b>0,34</b> (0,02)	<b>0,44</b> (0,007)	0,22 (ns)
<b>eGFR</b>	<b>-0,48</b> (0,001)	<b>-0,30</b> (0,05)	-0,33 (ns)

**r** na prvním rádku buněk, **p** v závorkách

ACR, poměr albumin/kreatinin; eGFR, odhadovaná glomerulární filtrace; HbA<sub>1c</sub>, glykovaný hemoglobin; ICAM-1, intercelulární adhezní molekula; sRAGE, solubilní receptor pro konečné produkty pokročilé glykace; vWF, von Willebrandův faktor

## 10 Diskuze

Níže jsou diskutovány hlavní výsledky jednotlivých článků, detailní diskuze je pak součástí originálních publikací v příloze.

### 10.1 Studie 1: RAGE a RAGE ligandy (Příloha 1)

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 mechanizmy se mohou uplatňovat v různých stádiích rozvoje diabetu a diabetických komplikací.

V minulosti byla opakováně 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. Opakováně 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 organizmu zánětem, a dále právě renálních funkcích. Navíc byla rovněž nezávisle na jiných rizikových faktorech opakováně prezentována i významná asociace mezi sRAGE a rozvojem diabetické nefropatie (Klein R. et al., 2017, Thomas M. C. et al., 2015).

Diabetes v organizmu 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 organizmu a nemusí odrážet dlouhodobou prognózu jedince s diabetem.

## 10.2 Studie 2: Polymorfizmy FN3K a GLO1 (Příloha 2)

Tato 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 ukázali 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 rozdíl 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 (Kalousová 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 polymorfismus nemusí mít na aktivitu enzymu vliv, tak jak kupříkladu ukázala recentní studie s polymorfizmem FN3K rs1056534 (Cikomola J. C. et al., 2017).

### **10.3 Studie 3: Kožní autofluorescence (Příloha 3)**

Naše publikace jako první ukazuje 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 organizmu či jde jen o nespecifický ukazatel chronického zánětu.

V naší studii jsme nesrovnávali míru akumulace AGEs v podkoží měřené pomocí kožní autofluorescence s kožními biopsiami, 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 organizmu, 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 mechanizmy, např. endotelová aktivace/dysfunkce, deglykační mechanizmy a další doposud ne zcela detailně popsané dráhy.

Opakováně 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.

## **10.4 Další cíle výzkumu**

Naše výsledky podobně jako větší mezinárodní studie potvrzují spíše malý vliv polymorfismů vybraných genů na rozvoj diabetických komplikací. Zatím se nezdá, že by jakýkoliv z vtipovaných polymorfismů měl takovou váhu, aby byl silným prediktorem rozvoje cévních komplikací.

V dalším výzkumu se proto chceme zaměřit spíše na stanovování enzymatických aktivit, obzvláště protektivních deglykačních enzymů, a posoudit jejich vliv na rozvoj cévních komplikací.

Zároveň budeme pokračovat v longitudinálním sledování pacientů s diabetem z pohledu kožní autofluorescence, abychom mohli přesněji posoudit prediktivní možnosti tohoto parametru k odhadu klinického rizika rozvoje diabetické mikro- a makroangiopatie.

## 11 Závěr

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 mechanizmů 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 polymorfismů *FN3K* (rs1056534), *FN3K* (rs3848403) a *GLO1* (rs4746). Rozdíly nebyly patrný 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.

## **12 Seznam literatury:**

Abiko, T., Abiko, A., Ishiko, S., Takeda, M., Horiuchi, S. and Yoshida, A. Relationship between autofluorescence and advanced glycation end products in diabetic lenses. *Exp Eye Res* **68**, 361-366 (1999).

Ahmed, N. Advanced glycation endproducts - role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Prt* **67**, 3-21 (2005).

Aronson, D. and Rayfield, E. J. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovasc Diabetol* **1**(2002).

Ashraf, J. M., Ahmad, S., Choi, I., Ahmad, N., Farhan, M., Tatyana, G. and Shahab, U. Recent advances in detection of AGEs: Immunochemical, bioanalytical and biochemical approaches. *Iubmb Life* **67**, 897-913 (2015).

Avemaria, F., Carrera, P., Lapolla, A., Sartore, G., Chilelli, N. C., Paleari, R., Ambrosi, A., Ferrari, M. and Mosca, A. Possible role of fructosamine 3-kinase genotyping for the management of diabetic patients. *Clin Chem Lab Med* **53**, 1315-1320 (2015).

Barua, M., Jenkins, E. C., Chen, W. Q., Kuizon, S., Pullarkat, R. K. and Junaid, M. A. Glyoxalase I Polymorphism rs2736654 Causing the Ala111Glu Substitution Modulates Enzyme Activity-Implications for Autism. *Autism Research* **4**, 262-270 (2011).

Berezin, A. Metabolic memory phenomenon in diabetes mellitus: Achieving and perspectives. *Diabetes & Metabolic Syndrome-Clinical Research & Reviews* **10**, S176-S183 (2016).

Bertoluci, M. C., Ce, G. V., da Silva, A. M. V., Wainstein, M. V., Boff, W. and Punales, M. Endothelial dysfunction as a predictor of cardiovascular disease in type 1 diabetes. *World J Diab* **6**, 679-692 (2015).

Bierhaus, A. and Nawroth, P. P. Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia* **52**, 2251-2263 (2009).

Bleeker, J. C., Vanbest, J. A., Vrij, L., Vandervelde, E. A. and Oosterhuis, J. A. Autofluorescence of the lens in diabetic and healthy-subjects by fluorophotometry. *Invest Ophth Vis Sci* **27**, 791-794 (1986).

Boyd, A. C., Abdel-Wahab, Y. H. A., McKillop, A. M., McNulty, H., Barnett, C. R., O'Harte, F. P. M. and Flatt, P. R. Impaired ability of glycated insulin to regulate plasma glucose and stimulate glucose transport and metabolism in mouse abdominal muscle. *BBA - General Subjects* **1523**, 128-134 (2000).

Brownlee, M. The pathobiology of diabetic complications - A unifying mechanism. *Diabetes* **54**, 1615-1625 (2005).

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

Cai, W. J., Ramdas, M., Zhu, L., Chen, X., Striker, G. E. and Vlassara, H. Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1. *P Natl Acad Sci USA* **109**, 15888-15893 (2012).

Cekic, E. G., Basaran, O., Basaran, N. F., Elmas, O., Dogan, V., Mert, G. O., Mert, K. U., Altun, I., Akin, F. and Biteker, M. Cutaneous microvascular reactivity and aortic elasticity in coronary artery disease: Comparison of the laser Doppler flowmetry and echocardiography. *Microvascular Research* **109**, 19-25 (2017).

Ceriello, A., Esposito, K., Piconi, L., Ihnat, M. A., Thorpe, J. E., Testa, R., Boemi, M. and Giugliano, D. Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients. *Diabetes* **57**, 1349-1354 (2008).

Ceriello, A., Novials, A., Ortega, E., Pujadas, G., La Sala, L., Testa, R., Bonfigli, A. R. and Genovese, S. Hyperglycemia following recovery from hypoglycemia worsens endothelial damage and thrombosis activation in type 1 diabetes and in healthy controls. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **24**, 116-123 (2014).

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).

Cracowski, J. L. and Roustit, M. Current Methods to Assess Human Cutaneous Blood Flow: An Updated Focus on Laser-Based-Techniques. *Microcirculation* **23**, 337-344 (2016).

Delpierre, G. and Van Schaftingen, E. Fructosamine 3-kinase, an enzyme involved in protein deglycation. *Biochem Soc T* **31**, 1354-1357 (2003).

Delpierre, G., Veiga-Da-Cunha, M., Vertommen, D., Buysschaert, M. and Van Schaftingen, E. Variability in erythrocyte fructosamine 3-kinase activity in humans correlates with polymorphisms in the FN3K gene and impacts on haemoglobin glycation at specific sites. *Diabetes & Metabolism* **32**, 31-39 (2006).

Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M. and Rodriguez, H. Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine* **32**, 1102-1115 (2002).

Dornadula, S., Elango, B., Balashanmugam, P., Palanisamy, R. and Mohanram, R. K. Pathophysiological Insights of Methylglyoxal Induced Type-2 Diabetes. *Clin Res Toxicol* **28**, 1666-1674 (2015).

Du, X. L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I. G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J. and Brownlee, M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *P Natl Acad Sci USA* **97**, 12222-12226 (2000).

Du, X. L., Matsumura, T., Edelstein, D., Rossetti, L., Zsengeller, Z., Szabo, C. and Brownlee, M. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest* **112**, 1049-1057 (2003).

Duckworth, W., Abraira, C., Moritz, T., Reda, D., Emanuele, N., Reaven, P. D., Zieve, F. J., Marks, J., Davis, S. N., Hayward, R., Warren, S. R., Goldman, S., McCarren, M., Vitek, M. E., Henderson, W. G., Huang, G. D. and Investigators, V. Glucose Control and Vascular Complications in Veterans with Type 2 Diabetes. *NEJM* **360**, 129-U162 (2009).

Feener, E. P., Xia, P., Inoguchi, T., Shiba, T., Kunisaki, M. and King, G. L. Role of protein kinase C in glucose- and angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor expression. Progression of Chronic Renal Diseases. H. Koide and I. Ichikawa. *118*: 180-187 (1996).

Flammer, A. J., Anderson, T., Celermajer, D. S., Creager, M. A., Deanfield, J., Ganz, P., Hamburg, N. M., Luscher, T. F., Shechter, M., Taddei, S., Vita, J. A. and Lerman, A. The Assessment of Endothelial Function From Research Into Clinical Practice. *Circulation* **126**, 753-767 (2012).

Foerster, A. and Henle, T. Glycation in food and metabolic transit of dietary AGEs (advanced glycation end-products): studies on the urinary excretion of pyrraline. *Biochem Soc T* **31**, 1383-1385 (2003).

Fokkens, B. T. and Smit, A. J. Skin fluorescence as a clinical tool for non-invasive assessment of advanced glycation and long-term complications of diabetes. *Glycoconjugate J* **33**, 527-535 (2016).

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).

Ganz, M. B. and Seftel, A. Glucose-induced changes in protein kinase C and nitric oxide are prevented by vitamin E. *Am J Phys Endocr Metabol* **278**, E146-E152 (2000).

Genuth, S., Sun, W. J., Cleary, P., Sell, D. R., Dahms, W., Malone, J., Sivitz, W., Monnier, V. M. and Ancillary, D. S. C. 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* **54**, 3103-3111 (2005).

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).

Gerrits, E. G., Lutgers, H. L., Kleefstra, N., Graaff, R., Groenier, K. H., Smit, A. J., Gans, R. O. and Bilo, H. J. Skin autofluorescence - A tool to identify type 2 diabetic patients at risk for developing microvascular complications. *Diab Care* **31**, 517-521 (2008).

Gerstein, H. C., Miller, M. E., Byington, R. P., Goff, D. C., Bigger, J. T., Buse, J. B., Cushman, W. C., Genuth, S., Ismail-Beigi, F., Grimm, R. H., Probstfield, J. L., Simons-Morton, D. G., Friedewald, W. T. and Act Control Cardiovasc Risk, D. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *NEJM* **358**, 2545-2559 (2008).

Giacco, F. and Brownlee, M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* **107**, 1058-1070 (2010).

Giacco, F., Du, X., D'Agati, V. D., Milne, R., Sui, G., Geoffrion, M. and Brownlee, M. Knockdown of glyoxalase 1 mimics diabetic nephropathy in nondiabetic mice. *Diabetes* **63**, 291-299 (2014).

Gugliucci, A. "Blinding" of AMP-dependent kinase by methylglyoxal: A mechanism that allows perpetuation of hepatic insulin resistance? *Medical Hypotheses* **73**, 921-924 (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).

Haitoglou, C. S., Tsilibary, E. C., Brownlee, M. and Charonis, A. S. Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glucosylated laminin type-IV collagen. *J Biol Chem* **267**, 12404-12407 (1992).

Hartog, J. W. L., Hummel, Y. M., Voors, A. A., Schalkwijk, C. G., Miyata, T., Huisman, R. M., Smit, A. J. and Van Veldhuisen, D. J. Skin-autofluorescence, a measure of tissue advanced glycation end-products (AGEs), is related to diastolic function in dialysis patients. *Journal of Cardiac Failure* **14**, 596-602 (2008).

Holman, R. R., Paul, S. K., Bethel, M. A., Matthews, D. R. and Neil, H. A. W. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *NEJM* **359**, 1577-1589 (2008).

Houben, A., Schaper, N. C., Slaaf, D. W., Tangelde, G. J. and Kruseman, A. C. N. Skin blood-cell flux in insulin-dependent diabetic subjects in relation to retinopathy or incipient nephropathy. *Europ J Clin Invest* **22**, 67-72 (1992).

Hudson, B. I., Kalea, A. Z., Del Mar Arriero, M., Harja, E., Boulanger, E., D'Agati, V. and Schmidt, A. M. Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with diaphanous-1 is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem* **283**, 34457-34468 (2008).

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).

Jorneskog, G., Brismar, K. and Fagrell, B. Skin capillary circulation severely impaired in toes of patients with IDDM, with and without late diabetic complications. *Diabetologia* **38**, 474-480 (1995).

Kaiser, N., Sasson, S., Feener, E. P., Boukobzavardi, N., Higashi, S., Moller, D. E., Davidheiser, S., Przybylski, R. J. and King, G. L. Differential regulation of glucose-transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth-muscle cells. *Diabetes* **42**, 80-89 (1993).

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).

Katakami, N., Matsuhisa, M., Kaneto, H., Matsuoka, T. A., Sakamoto, K., Yasuda, T. and Yamasaki, Y. Endogenous secretory RAGE but not soluble RAGE is associated with carotid atherosclerosis in type 1 diabetes patients. *Diab Vasc Dis Re* **5**, 190-197 (2008).

Kayama, Y., Raaz, U., Jagger, A., Adam, M., Schellinger, I. N., Sakamoto, M., Suzuki, H., Toyama, K., Spin, J. M. and Tsao, P. S. Diabetic Cardiovascular Disease Induced by Oxidative Stress. *Int J Mol Sci* **16**, 25234-25263 (2015).

Kim, J. J. and Sears, D. D. TLR4 and Insulin Resistance. *Gastroent Res Prac* (2010).

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).

Klang, G. Measurements and studies of the fluorescence of the human lens in vivo. *Acta Ophthalmol* **31**, 1-152 (1948).

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).

Koetsier, M., Lutgers, H. L., de Jonge, C., Links, T. P., Smit, A. J. and Graaff, R. Reference Values of Skin Autofluorescence. *Diabetes Technol The* **12**, 399-403 (2010).

Kolm-Litty, V., Sauer, U., Nerlich, A., Lehmann, R. and Schleicher, E. D. High glucose-induced transforming growth factor beta 1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* **101**, 160-169 (1998).

Kosaki, A., Hasegawa, T., Kimura, T., Iida, K., Hitomi, J., Matsubara, H., Mori, Y., Okigaki, M., Toyoda, N., Masaki, H., Inoue-Shibata, M., Nishikawa, M. and Iwasaka, T. Increased plasma S100A12 (EN-RAGE) levels in patients with type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**, 5423-5428 (2004).

Kouidrat, Y., Zaitouni, A., Amad, A., Diouf, M., Desailloud, 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).

Koulis, C., Watson, A. M. D., Gray, S. T. and Jandeleit-Dahm, K. A. Linking RAGE and Nox in diabetic micro- and macrovascular complications. *Diabetes & Metabolism* **41**, 272-281 (2015).

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).

Kuboki, K., Jiang, Z. Y., Takahara, N., Ha, S. W., Igarashi, M., Yamauchi, T., Feener, E. P., Herbert, T. P., Rhodes, C. J. and King, G. L. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo A specific vascular action of insulin. *Circulation* **101**, 676-681 (2000).

Kuricova, K., Pacal, L., Soupal, J., Prazny, M. and Kankova, K. Effect of glucose variability on pathways associated with glucotoxicity in diabetes: Evaluation of a novel in vitro experimental approach. *Diabetes Res Clin Prt* **114**, 1-8 (2016).

Lachin, J. M., Bebu, I., Nathan, D. M., Zinman, B., Brillon, D., Backlund, J. Y. C., Cleary, P., Orchard, T. J. and Diabet Control Complications, T. Mortality in Type 1 Diabetes in the DCCT/EDIC Versus the General Population. *Diab Care* **39**, 1378-1383 (2016).

Leahy, J. L. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* **36**, 197-209 (2005).

Lee, B. W., Chae, H. Y., Kwon, S. J., Park, S. Y., Ihm, J. and Ihm, S. H. RAGE ligands induce apoptotic cell death of pancreatic beta-cells via oxidative stress. *Int J Mol Med* **26**, 813-818 (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).

Li, Y. M., Mitsuhashi, T., Wojciechowicz, D., Shimizu, N., Li, J., Stitt, A., He, C., Banerjee, D. and Vlassara, H. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation

endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11047-11052 (1996).

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).

Lutgers, H. L., Gerrits, E. G., Graaff, R., Links, T. P., Sluiter, W. J., Gans, R. O., Bilo, H. J. and Smit, A. J. 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* **52**, 789-797 (2009).

Ma, W., Rai, V., Hudson, B. I., Song, F., Schmidt, A. M. and Barile, G. R. RAGE binds C1q and enhances C1q-mediated phagocytosis. *Cell Immunol* **274**, 72-82 (2012).

Makita, Z., Radoff, S., Rayfield, E. J., Yang, Z., Skolnik, E., Delaney, V., Friedman, E. A., Cerami, A. and Vlassara, H. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *NEJM* **325**, 836-842 (1991).

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).

McNulty, M., Mahmud, A. and Feely, J. Advanced glycation end-products and arterial stiffness in hypertension. *Am J Hypertension* **20**, 242-247 (2007).

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).

Miyata, T., de Strihou, C. V., Imasawa, T., Yoshino, A., Ueda, Y., Ogura, H., Kominami, K., Onogi, H., Inagi, R., Nangaku, M. and Kurokawa, K. Glyoxalase I deficiency is associated with an unusual level of advanced glycation end products in a hemodialysis patient. *Kidney International* **60**, 2351-2359 (2001).

Miyazaki, A., Nakayama, H. and Horiuchi, S. Scavenger receptors that recognize advanced glycation end products. *Trends in cardiovascular medicine* **12**, 258-262 (2002).

Mohas, M., Kisfali, P., Baricza, E., Merei, A., Maasz, A., Cseh, J., Mikolas, E., Szijarto, I. A., Melegh, B. and Wittmann, I. A Polymorphism within the Fructosamine-3-kinase Gene is Associated with HbA(1c) Levels and the Onset of Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocr Diab* **118**, 209-212 (2010).

Monnier, V. M., Sun, W. J., Sell, D. R., Fan, X. J., Nemet, I. and Genuth, S. Glucosepane: a poorly understood advanced glycation end product of growing importance for diabetes and its complications. *Clin Chem Lab Med* **52**, 21-32 (2014).

Monnier, V. M., Vishwanath, V., Frank, K. E., Elmets, C. A., Dauchot, P. and Kohn, R. R. Relation between complications of Type-I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *NEJM* **314**, 403-408 (1986).

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).

Nagaraj, R. H., Linetsky, M. and Stitt, A. W. The pathogenic role of Maillard reaction in the aging eye. *Amino Acids* **42**, 1205-1220 (2012).

Nepper, M., Schmidt, A. M., Brett, J., Yan, S. D., Wang, F., Pan, Y. C., Elliston, K., Stern, D. and Shaw, A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* **267**, 14998-15004 (1992).

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).

Noordzij, M. J., Mulder, D. J., Oomen, P. H. N., Brouwer, T., Jager, J., Cabezas, M. C., Lefrandt, J. D. and Smit, A. J. Skin autofluorescence and risk of micro- and macrovascular complications in patients with Type 2 diabetes mellitus-a multi-centre study. *Diab Med* **29**, 1556-1561 (2012).

Ohgami, N., Nagai, R., Ikemoto, M., Arai, H., Kuniyasu, A., Horiuchi, S. and Nakayama, H. Cd36, a member of the class b scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* **276**, 3195-3202 (2001).

Ohgami, N., Nagai, R., Ikemoto, M., Arai, H., Miyazaki, A., Hakamata, H., Horiuchi, S. and Nakayama, H. CD36, serves as a receptor for advanced glycation endproducts (AGE). *J Diabetes Complications* **16**, 56-59 (2002).

Onorato, J. M., Thorpe, S. R. and Baynes, J. W. Immunohistochemical and ELISA assays for biomarkers of oxidative stress in aging and disease. Towards Prolongation of the Healthy

Life Span: Practical Approaches to Intervention. D. Harman, R. Holliday and M. Meydani. **854**: 277-290 (1998).

Ott, C., Jacobs, K., Haucke, E., Navarrete Santos, A., Grune, T. and Simm, A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling(). *Redox Biol* **2**, 411-429 (2014).

Palmieri, B. and Sblendorio, V. Oxidative stress tests: overview on reliability and use. Part I. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **11**, 309-342 (2007a).

Palmieri, B. and Sblendorio, V. Oxidative stress tests: overview on reliability and use. Part II. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **11**, 383-399 (2007b).

Patel, A., MacMahon, S., Chalmers, J., Neal, B., Billot, L., Woodward, M., Marre, M., Cooper, M., Glasziou, P., Grobbee, D., Hamet, P., Harrap, S., Heller, S., Liu, L. S., Mancia, G., Mogensen, C. E., Pan, C. Y., Poulter, N., Rodgers, A., Williams, B., Bompain, S., de Galan, B. E., Joshi, R., Travert, F. and Grp, A. C. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *NEJM* **358**, 2560-2572 (2008).

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).

Queisser, M. A., Yao, D. C., Geisler, S., Hammes, H. P., Lochner, G., Schleicher, E. D., Brownlee, M. and Preissner, K. T. Hyperglycemia Impairs Proteasome Function by Methylglyoxal. *Diabetes* **59**, 670-678 (2010).

Rai, V., Maldonado, A. Y., Burz, D. S., Reverdatto, S., Yan, S. F., Schmidt, A. M. and Shekhtman, A. Signal transduction in receptor for advanced glycation end products (RAGE): solution structure of C-terminal rage (ctRAGE) and its binding to mDia1. *J Biol Chem* **287**, 5133-5144 (2012a).

Rai, V., Toure, F., Chitayat, S., Pei, R., Song, F., Li, Q., Zhang, J., Rosario, R., Ramasamy, R., Chazin, W. J. and Schmidt, A. M. Lysophosphatidic acid targets vascular and oncogenic pathways via RAGE signaling. *J Exp Med* **209**, 2339-2350 (2012b).

Ramasamy, R., Shekhtman, A. and Schmidt, A. M. The multiple faces of RAGE - opportunities for therapeutic intervention in aging and chronic disease. *Expert Opin Ther Tar* **20**, 431-446 (2016).

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).

Reiniger, N., Lau, K., McCalla, D., Eby, B., Cheng, B., Lu, Y., Qu, W., Quadri, N., Ananthakrishnan, R., Furmansky, M., Rosario, R., Song, F., Rai, V., Weinberg, A., Friedman, R., Ramasamy, R., D'Agati, V. and Schmidt, A. M. Deletion of the receptor for advanced glycation end products reduces glomerulosclerosis and preserves renal function in the diabetic OVE26 mouse. *Diabetes* **59**, 2043-2054 (2010).

Rosca, M. G., Mustata, T. G., Kinter, M. T., Ozdemir, A. M., Kern, T. S., Szweda, L. I., Brownlee, M., Monnier, V. M. and Weiss, M. F. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Am J Phys Ren Phys* **289**, F420-F430 (2005).

Rudijanto, A. The expression and down stream effect of lectin like-oxidized low density lipoprotein 1 (LOX-1) in hyperglycemic state. *Acta Med Indones* **39**, 36-43 (2007).

Sachdeva, S. Fitzpatrick skin typing: Applications in dermatology. *Ind J Dermatol Ve* **75**, 93-96 (2009).

Saisho, Y. Glycemic Variability and Oxidative Stress: A Link between Diabetes and Cardiovascular Disease? *Int J Mol Sci* **15**, 18381-18406 (2014).

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).

Shen, X., Zheng, S. R., Metreveli, N. S. and Epstein, P. N. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* **55**, 798-805 (2006).

Shui, Y. B. and Beebe, D. C. Age-dependent control of lens growth by hypoxia. *Invest Ophth Vis Sci* **49**, 1023-1029 (2008).

Schisano, B., Tripathi, G., McGee, K., McTernan, P. G. and Ceriello, A. Glucose oscillations, more than constant high glucose, induce p53 activation and a metabolic memory in human endothelial cells. *Diabetologia* **54**, 1219-1226 (2011).

Schmidt, A. M., Vianna, M., Gerlach, M., Brett, J., Ryan, J., Kao, J., Esposito, C., Hegarty, H., Hurley, W., Clauss, M., Wang, F., Pan, Y. C. E., Tsang, T. C. and Stern, D. Isolation and characterization of 2 binding-proteins for advanced glycosylation end-products from bovine lung which are present on the endothelial-cell surface. *J Biol Chem* **267**, 14987-14997 (1992).

Schwartz, S. S., Epstein, S., Corkey, B. E., Grant, S. F. A., Gavin, J. R. and Aguilar, R. B. The Time Is Right for a New Classification System for Diabetes: Rationale and Implications of the beta-Cell-Centric Classification Schema. *Diab Care* **39**, 179-186 (2016).

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).

Skrha, J., Prazny, M., Haas, T., Kvasnicka, J. and Kalvodova, B. Comparison of laser-Doppler flowmetry with biochemical indicators of endothelial dysfunction related to early microangiopathy in Type 1 diabetic patients. *J Diabetes Complicat* **15**, 234-240 (2001).

Skrha, J., Soupal, J., Skrha Jr., J. and Prazny, M. Glucose variability, HbA1c and microvascular complications. *Rev Endocr Metab Dis* **17**, 103-110 (2016).

Skrha Jr., J., Kalousova, M., Svarcova, J., Muravska, A., Kvasnicka, J., Landova, L. and Zima, T. Relationship of Soluble RAGE and RAGE Ligands HMGB1 and EN-RAGE to Endothelial Dysfunction in Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocr Diab* **120**, 277-281 (2012).

Skrha Jr., J., Muravska, A., Flekac, M., Horova, E., Novak, J., Novotny, A., Prazny, M., Skrha, J., Kvasnicka, J., Landova, L., Jachymova, M., Zima, T. and Kalousova, M. Fructosamine 3-Kinase and Glyoxalase I Polymorphisms and Their Association With Soluble RAGE and Adhesion Molecules in Diabetes. *Phys Res* **63**, S283-S291 (2014).

Skrha Jr., J., Soupal, J., Ekali, G. L., Prazny, M., Kalousova, M., Kvasnicka, J., Landova, L., Zima, T. and Skrha, J. Skin Autofluorescence Relates to Soluble Receptor for Advanced Glycation End-Products and Albuminuria in Diabetes Mellitus. *J Diab Res* (2013).

Smedsrød, B., Melkko, J., Araki, N., Sano, H. and Horiuchi, S. Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells. *Biochem J* **322**, 567-573 (1997).

Song, F. and Schmidt, A. M. Glycation and Insulin Resistance Novel Mechanisms and Unique Targets? *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **32**, 1760-1765 (2012).

Soro-Paavonen, A., Zhang, W. Z., Venardos, K., Coughlan, M. T., Harris, E., Tong, D. C. K., Brasacchio, D., Paavonen, K., Chin-Dusting, J., Cooper, M. E., Kaye, D., Thomas, M. C. and Forbes, J. M. Advanced glycation end-products induce vascular dysfunction via resistance to nitric oxide and suppression of endothelial nitric oxide synthase. *J Hypertens* **28**, 780-788 (2010).

Soupal, J., Skrha, J., Jr., Fajmon, M., Horova, E., Mraz, M., Skrha, J. and Prazny, M. Glycemic Variability Is Higher in Type 1 Diabetes Patients with Microvascular Complications Irrespective of Glycemic Control. *Diabetes Technol The* **16**, 198-203 (2014).

Stirban, A., Gawlowski, T. and Roden, M. Vascular effects of advanced glycation endproducts: Clinical effects and molecular mechanisms. *Molecular Metabolism* **3**, 94-108 (2014).

Škrha, J. *Diabetologie, Galén*, 417s. (2009)

Takeuchi, M. Serum Levels of Toxic AGEs (TAGE) May Be a Promising Novel Biomarker for the Onset/Progression of Lifestyle-Related Diseases. *Diagnostics* **6**(2016).

Tamura, Y., Adachi, H., Osuga, J., Ohashi, K., Yahagi, N., Sekiya, M., Okazaki, H., Tomita, S., Iizuka, Y., Shimano, H., Nagai, R., Kimura, S., Tsujimoto, M. and Ishibashi, S. FEEL-1 and FEEL-2 are endocytic receptors for advanced glycation end products. *J Biol Chem* **278**, 12613-12617 (2003).

Tanhäuserová, V., Kuricová, K., Pácal, L., Bartáková, V., Řehořová, J., Svojanovský, J., Olšovský, J., Bílobrádková, J. and Kaòková, K. Genetic variability in enzymes of metabolic

pathways conferring protection against non-enzymatic glycation versus diabetes-related morbidity and mortality. *Clin Chem Lab Med* **52**, 77-83 (2014).

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).

Tomana, M., Prchal, J. T., Garner, L. C., Skalka, H. W. and Barker, S. A. Gas-chromatographic analysis of lens monosaccharides. *J Lab Clin Med* **103**, 137-142 (1984).

Turk, N., Mornar, A., Mrzljak, V. and Turk, Z. Urinary excretion of advanced glycation endproducts in patients with type 2 diabetes and various stages of proteinuria. *Diabetes & Metabolism* **30**, 187-192 (2004).

Uribarri, J., Woodruff, S., Goodman, S., Cai, W. J., Chen, X., Pyzik, R., Yong, A., Striker, G. E. and Vlassara, H. Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet. *J Am Diet Assoc* **110**, 911-916 (2010).

Vannas M, W. A. Eine Methode zur Meesung der Fluorenzenz (lor lehnden menschlichen Augenlinse und eine Untersuchung über ihre Abhängigkeit). *Alter Klin Monatabl Augenh.* **95**, 53–64 (1938).

Vazzana, N., Santilli, F., Cuccurullo, C. and Davi, G. Soluble forms of RAGE in internal medicine. *Intern Emerg Med* **4**, 389-401 (2009).

Vikramadithyan, R. K., Hu, Y. Y., Noh, H. L., Liang, C. P., Hallam, K., Tall, A. R., Ramasamy, R. and Goldberg, I. J. Human aldose reductase expression accelerates diabetic atherosclerosis in transgenic mice. *J Clin Invest* **115**, 2434-2443 (2005).

Vinik, A. I., Erbas, T., Park, T. S., Pierce, K. K. and Stansberry, K. B. Methods for evaluation of peripheral neurovascular dysfunction. *Diabetes Technol Ther* **3**, 29-50 (2001).

Vlassara, H., Li, Y. M., Imani, F., Wojciechowicz, D., Yang, Z., Liu, F. T. and Cerami, A. Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* **1**, 634-646 (1995).

Vlassara, H. and Striker, G. E. Advanced Glycation Endproducts in Diabetes and Diabetic Complications. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* **42**, 697-719 (2013).

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).

Wautier, J. L. and Grossin, N. sRAGE and esRAGE. *Diabetes & Metabolism* **34**, 631-631 (2008).

Wautier, M. P., Chappey, O., Corda, S., Stern, D. M., Schmidt, A. M. and Wautier, J. L. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E685-694 (2001).

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).

Wu, H., Chen, Z., Xie, J., Kang, L. N., Wang, L. and Xu, B. High Mobility Group Box-1: A Missing Link between Diabetes and Its Complications. *Mediators of Inflammation* (2016).

Xie, J., Mendez, J. D., Mendez-Valenzuela, V. and Aguilar-Hernandez, M. M. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cell Signal* **25**, 2185-2197 (2013).

Xie, Z. L., Zhang, J. H., Wu, J. L., Viollet, B. and Zou, M. H. Upregulation of Mitochondrial Uncoupling Protein-2 by the AMP-Activated Protein Kinase in Endothelial Cells Attenuates Oxidative Stress in Diabetes. *Diabetes* **57**, 3222-3230 (2008).

Yamamoto, Y., Harashima, A., Saito, H., Tsuneyama, K., Munesue, S., Motoyoshi, S., Han, D., Watanabe, T., Asano, M., Takasawa, S., Okamoto, H., Shimura, S., Karasawa, T., Yonekura, H. and Yamamoto, H. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. *J Immunol* **186**, 3248-3257 (2011).

Yan, S. F., Ramasamy, R. and Schmidt, A. M. Receptor for AGE (RAGE) and its ligands—cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response. *J Mol Med* **87**, 235-247 (2009).

Yan, S. F., Ramasamy, R. and Schmidt, A. M. Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochem Pharmacol* **79**, 1379-1386 (2010).

Yao, D. and Brownlee, M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes* **59**, 249-255 (2010).

Yerneni, K. K. V., Bai, W., Khan, B. V., Medford, R. M. and Natarajan, R. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappa B in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* **48**, 855-864 (1999).

Yonekura, H., Yamamoto, Y., Sakurai, S., Petrova, R. G., Abedin, M. J., Li, H., Yasui, K., Takeuchi, M., Makita, Z., Takasawa, S., Okamoto, H., Watanabe, T. and Yamamoto, H. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J* **370**, 1097-1109 (2003).

Zhao, S. Z., Li, T., Li, J., Lu, Q. Y., Han, C. J., Wang, N., Qiu, Q. H., Cao, H., Xu, X., Chen, H. B. and Zheng, Z. miR-23b-3p induces the cellular metabolic memory of high glucose in diabetic retinopathy through a SIRT1-dependent signalling pathway. *Diabetologia* **59**, 644-654 (2016).

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

## 13 Seznam publikací autora

### 13.1 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. **Příloha 1.** **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. **Příloha 2.** **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. **Příloha 3.** **IF = 3,54.**

### 13.2 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.**

### 13.3 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

### **13.4 Abstrakta autora z mezinárodních kongresů související s dizertační prací**

- **Škrha J. jr.**, Flekač M., Horová E., Muravská A., Kalousová M., Prázný M., Škrha J. *Fructosamine 3-kinase and glyoxalase I polymorphisms and their association with development of vascular complications in diabetes: a 10-year follow-up study.* 53st Annual Meeting of the EASD, Lisbon; Diabetologia 60, Supplement 1; 2017
- **Škrha J. jr.**, Pelcl T., Šoufal J., Kalousová M., Prázný M., Škrha J. *Diabetic neuropathy is associated with oxidative stress and endothelial activation in patients with type 1 diabetes.* 77th Scientific Sessions, San Diego, USA; 2017
- **Škrha J. jr.**, Prázný M., Šoufal J., Kalousová M., Škrha J. *Microvascular reactivity relates to the skin autofluorescence but not to soluble receptor for advanced glycation endproducts in patients with diabetes.* International Symposium on Diabetic Complications, Heidelberg, Německo; 2015
- **Škrha J. jr.**, Šoufal J., Prázný M., Škrha J. *Lens autofluorescence relates to skin autofluorescence but poorly to glycated hemoglobin in patients with diabetes.* 51st Annual Meeting of the EASD, Stockholm; Diabetologia 56, Supplement 1; 2015
- **Škrha J. jr.**, Šoufal J., Prázný M., Škrha J. *Relationship of the lens and skin autofluorescence in patients with diabetes.* 75th Scientific Sessions, Boston, USA; 2015
- **Škrha J. jr.**, Šoufal J., Kalousová M., Míková R., Prázný M., Škrha J. *Soluble receptor for advance glycation end-products (sRAGE) relates to oxidative stress index in patients with diabetes.* 50th Annual Meeting of the EASD, Vídeň; Diabetologia 55, Supplement 1; 2014
- **Škrha J. jr.**, Šoufal J., Kalousová M., Míková R., Prázný M., Škrha J. *Soluble receptor for advanced glycation endproducts is related to oxidative stress in patients with diabetes.* 74th Scientific Sessions, San Francisco, USA; 2014
- **Škrha J. jr.**, Šoufal J., Landová L., Kvasnička J., Prázný M., Škrha J. *Skin microvascular reactivity relates to advanced glycation end-products accumulation and endothelial activation in patients with diabetes.* 49<sup>th</sup> Annual Meeting of the EASD, Barcelona; Diabetologia 54, Supplement 1; 2013

- Škrha J. jr., Šoupal J., Loni GE., Kalousová M., Prázný M., Škrha J. *Skin autofluorescence reflects microvascular impairment in patients with diabetes.* 73rd Scientific Sessions, Chicago, USA; 2013
- Škrha J. jr., Prázný M., Šoupal J., Štulc T., Landová L., Kvasnička J., Jarolímková M., Škrha J., Kalousová M. *Does short-term very low calorie diet have positive effect on endothelial activation in obese Type 2 diabetic patients?* The Fourth World Congress on Controversies to Consensus in Diabetes, Obesity and Hypertension; Barcelona; 2012
- Škrha J. jr., Šoupal J., Loni GE., Kalousová M., Kvasnička J., Landová L., Prázný M., Škrha J. *Biomarkers of vascular changes in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus related to skin autofluorescence.* IDF International Congress, Dubaj, UAE; 2011
- Škrha J. jr., Šoupal J., Loni GE., Švarcová J., Kalousová M., Prázný M., Škrha J.: *Skin autofluorescence relates to soluble receptor for advanced glycation endproducts in diabetic patients.* 47th Annual Meeting of the EASD, Lisabon; Diabetologia 54, Supplement: 1; 2011
- Škrha J. jr., Prázný M., Šoupal J., Kalousová M., Škrha J. *Skin autofluorescence but not soluble receptor for advanced glycation endproducts relates to microvascular reactivity in diabetic patients.* Joint Meeting of the European Society for Microcirculation (ESM)/Society of Microcirculation and Vascular Biology (GfMVB); Mnichov; Journal of Vascular Research 48, Supplement: 1; 2011
- Škrha J. jr., Germanová A., Švarcová J., Kalousová M., Zima T., Škrha J. *Soluble receptor for advanced glycation endproducts and its inflammatory ligands EN-RAGE and HMGB1 in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus.* 46th Annual Meeting of EASD, Stockholm; Diabetologia 53, Supplement: 1; 2010
- Škrha J. jr., Germanová A., Švarcová J., Kalousová M., Zima T., Škrha J. *Controversies in soluble receptor for advanced glycation endproducts and EN-RAGE in T1 and T2 diabetes mellitus.* The Third World Congress on Controversies to Consensus in Diabetes, Obesity and Hypertension; Praha; 2010

- Škrha J. jr., Gáll J., Buchal R., Sedláčková E., Pláteník J. *The effect of glucose and glucose metabolites on caldium-induced mitochondrial permeability transition (MPT)*. 45th Annual Meeting of the EASD, Vídeň; Diabetologia 52, S498-S498; 2009
- Škrha J. jr., Gáll J., Buchal R., Sedláčková E., Pláteník J. *The influence of glucose metabolites on mitochondrial permeability transition*. 34th Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies, Praha; FEBS Journal 276, 345-345; 2009

## **14 Přílohy**

**Příloha 1.** Relationship of soluble RAGE and RAGE ligands HMGB1 and EN-RAGE to endothelial dysfunction in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus. (*strana 87*)

**Příloha 2.** Fructosamine 3-kinase and glyoxalase I polymorphisms and their association with soluble RAGE and adhesion molecules in diabetes. (*strana 92*)

**Příloha 3.** Skin autofluorescence relates to soluble receptor for advanced glycation end-products and albuminuria in diabetes mellitus. (*strana 101*)

# Relationship of Soluble RAGE and RAGE Ligands HMGB1 and EN-RAGE to Endothelial Dysfunction in Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus

## Authors

J. Škrha Jr<sup>1,2</sup>, M. Kalousová<sup>1</sup>, J. Švarcová<sup>1</sup>, A. Muravská<sup>1</sup>, J. Kvasnička<sup>1</sup>, L. Landová<sup>1</sup>, T. Zima<sup>1</sup>, J. Škrha<sup>2</sup>

## Affiliations

<sup>1</sup> Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

<sup>2</sup> 3<sup>rd</sup> Department of Internal Medicine, 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

## Key words

- soluble RAGE
- RAGE ligands
- endothelial dysfunction
- diabetes mellitus
- MMPs

## Abstract



**Aims:** Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) plays the essential role in the pathogenesis of diabetic vascular complications. The aim of the study was to compare concentration of soluble RAGE and its ligands (EN-RAGE and HMGB1) with different biochemical parameters in Type 1 (T1DM) and Type 2 (T2DM) diabetes mellitus.

**Methods:** Total number of 154 persons (45 T1DM, 68 T2DM, 41 controls) was examined and concentrations of sRAGE, EN-RAGE and HMGB1 were measured and compared to diabetes control, albuminuria, cell adhesion molecules and metalloproteinases (MMPs).

**Results:** Mean serum sRAGE concentration was higher in T1DM as compared to controls

( $1137 \pm 532$  ng/l vs.  $824 \pm 309$  ng/l,  $p < 0.01$ ). Similarly, EN-RAGE was significantly higher in both diabetic groups ( $p < 0.001$ ) and HMGB1 concentrations were elevated in T2DM patients ( $p < 0.01$ ). Significant relationship was found between MMP9 and HMGB1 and EN-RAGE in diabetic patients. Inverse relationship was observed between MMP2 and MMP9 in both types of diabetic patients ( $r = -0.602$ ,  $p < 0.002$  and  $r = -0.771$ ,  $p < 0.001$ ). Significant positive correlation was found between sRAGE and ICAM-1, VCAM-1 or vWF ( $p < 0.01$  to  $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** We conclude that serum sRAGE and RAGE ligands concentrations reflect endothelial dysfunction developing in diabetes.

received 21.03.2011  
firstdecision 26.06.2011  
accepted 27.06.2011

## Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1283161>  
Published online:  
April 27, 2012  
Exp Clin Endocrinol Diabetes  
© J. A. Barth Verlag in  
Georg Thieme Verlag KG  
Stuttgart · New York  
ISSN 0947-7349

## Correspondence

Dr. Jan Škrha Jr  
3<sup>rd</sup> Department of Internal Medicine  
1<sup>st</sup> Faculty of Medicine  
Charles University  
U Nemocnice 1  
128 08 Prague 2  
Czech Republic  
Tel.: +420/224/962992  
Fax: +420/224/919780  
jan.skrha@seznam.cz

## Introduction



Receptors for advanced glycation end products (RAGE) play the essential role in the pathogenesis of diabetic vascular complications. There are 3 major variants of RAGE: (A) full length transmembrane RAGE with extracellular and intracellular regions, (B) endogenous secretory RAGE (esRAGE) formed via alternative splicing of RAGE pre-mRNA transcripts and subsequently released into human plasma, having extracellular domain for binding with RAGE ligands but lacking the intracellular region for further intracellular signal transduction, and finally (C) soluble RAGE (sRAGE) detached from the full length RAGE by proteinases such as matrix metalloproteinases (MMPs) or A Desintegrin And Metalloprotease (ADAM-10), and having a similar "neutralizing" effect on RAGE ligands as esRAGE (Katakami et al., 2008; Vazzana et al., 2009; Wautier and Grossin, 2008; Yan et al., 2010). The soluble RAGE represents all circulating RAGE – both sRAGE

released by MMPs and esRAGE, as also discussed earlier (Sparvero et al., 2009). MMPs, apart from the role in sRAGE production, ensure remodeling of the extracellular matrix (ECM) and participate in many physiological and pathological processes (e.g., wound healing, organ development, inflammation, atherosclerosis, heart failure, diabetic vascular complications) (Kadoglou et al., 2005). The RAGEs are present at various cellular membranes, but most important for development of vascular wall changes are the ones on macrophages and endothelial cells. Activation of the ligand-RAGE axis results in acceleration of chronic inflammation via NFκB followed by enhanced expression of genes for adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, P-selectin, E-selectin), growth factors and cytokines (IFNγ, PDGF, TNFα, IL-1), induction of migration of macrophages, stimulation of cells proliferation, upregulation of pro-thrombotic pathways or increased synthesis of collagen IV, fibronectin and proteoglycans (Hofmann et al., 1999; Schmidt et al., 1995).

Initially, RAGE was named in accordance with its activation after binding advanced glycation endproducts (AGEs). At the present time, a wide range of substances called alarmins, such as S100 calgranulins (e.g., EN-RAGE – sometimes called S100A12), high mobility group box-1 (HMGB1), or amyloid- $\beta$  peptide, is known to bind and activate RAGE more potently than AGEs alone (Yao and Brownlee, 2010). Alarmins are present in physiological conditions, especially in acute inflammation, but their role is obviously also in promoting chronic inflammation as observed in diabetes, aging, atherosclerosis, tumorogenesis or neurodegenerative disorders (Bierhaus and Nawroth, 2009; Kosaki et al., 2004; Yan et al., 2009).

Diagnosis of diabetic angiopathy is often late when morphological changes in the vessel wall are already developed. Screening of biomarkers related to early vascular changes associated with endothelial dysfunction is therefore demanded. However, the most reliable biomarkers have not been confirmed yet. Moreover, classical markers of diabetes compensation ( $\text{HbA}_{1c}$  and glycemia) are no longer believed to be the best target for proper therapy (Nawroth et al., 2010).

The goal of this study was to evaluate serum levels of soluble RAGE and 2 representatives of alarmins (EN-RAGE and HMGB1) in Type 1 and Type 2 diabetic patients and to compare them with von Willebrand factor (vWF) and cell adhesion molecules as markers of endothelial activation. In addition, their relationship to matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9 as possible releasers of the RAGE extracellular domain has been evaluated.

## Subjects and Methods

### Subjects

The whole group consisted of 45 patients (22 males, 23 females) with Type 1 diabetes mellitus (T1DM) and 66 patients (46 males, 20 females) with Type 2 diabetes mellitus (T2DM). Their characteristics are shown in **Table 1**. Detailed clinical and laboratory examination performed in all diabetic patients selected for this study excluded severe diseases such as secondary hypertension, neurodegenerative disorders, known malignity or acute infections, which could have any significant influence on laboratory variables. Patients with urinary tract infection and all patients with severe renal impairment have been excluded as well. All Type 1 diabetic patients were on intensified insulin treatment using 4–5 insulin injections, 30 Type 2 diabetic patients were on metformin alone, 20 patients were on oral agents plus insulin

and the remaining 16 Type 2 diabetic patients were on insulin treatment only. 14 Type 1 and 33 Type 2 diabetic patients were treated by statins. ACE inhibitors or AT1 blockers were used in 18 Type 1 and 41 Type 2 diabetic patients. Control group created from blood donors of the Transfusion Unit consisted of 43 healthy persons (29 males, 14 females) of comparable age. The study was performed in accordance with principles of the Declaration of Helsinki and was approved by local Ethics Committee of the General University Hospital and First Faculty of Medicine. All examined persons have given their informed consent prior to entering the study.

## Biochemical methods

Fasting blood samples were collected between 7.00 and 8.00 a.m. from the cubital vein to the respective tubes. Routine biochemical parameters were determined in fresh samples, whereas for special biochemical analysis blood was collected into the tubes without anticoagulant, centrifuged for 10 min at 3000 rpm (rotations per minute) and serum then frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the time of the assay.

Serum concentrations of soluble RAGE were measured using sandwich ELISA (Quantikine, RD Systems, Minneapolis, MN, USA). This assay measures both C-truncated RAGE that has been cleaved from the cell surface, and esRAGE as well. Serum concentrations of EN-RAGE (Abnova, Taipei City, Taiwan) and HMGB1 (IBL, Hamburg, Germany) were determined by ELISA. Cell adhesion molecules E-selectin, P-selectin, intercellular cell adhesion molecule (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule (VCAM) were estimated by ELISA kits manufactured by RD System Europe (Abingdon, UK). Von Willebrand factor (vWF) was determined by Diagnostica Stago kit (Asnieres-sur-Seine, France). Matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9 have been determined by ELISA (Quantikine Immunoassay, RD Systems, Minneapolis, MN, USA). Due to log-normal distribution of the values decimal logarithm was calculated for further analysis. Routine biochemical parameters including urea, creatinine, transaminases, alkaline phosphatase,  $\gamma$ -glutamyltransferase, total cholesterol and triglycerides were determined by standard methods in a central laboratory on Modular Roche analyzer. Fasting plasma glucose was determined by glucose oxidase method on glucose analyzer Super GLAmbulance (Dr. Müller Gerätebau, Freital, Germany), glycated hemoglobin  $\text{HbA}_{1c}$  was measured by HPLC on Variant II (Biorad, France) and expressed according to IFCC standards (normal values are 2.8–4.0%).

	T1DM (n=45)	T2DM (n=66)	Controls (n=43)	ANOVA p-value
age (yrs)	47 (24–70)	64 (29–84)	56 (25–60)	
duration of DM (yrs)	18 (2–52)	9 (2–39)	–	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.9±2.7 <sup>z</sup>	29.0±4.6 <sup>c</sup>	25.7±3.9	<0.0001
SBP (mm Hg)	131±10	138±13	129±12	ns
DBP (mm Hg)	78±7	77±8	76±6	ns
creatinine (μmol/l)	77.7±16.8 <sup>y</sup>	98.1±48.1 <sup>b</sup>	75.0±19.2	0.0009
CRP (mg/l)	2.8±1.7	3.5±2.5	3.2±1.9	ns
cholesterol (mmol/l)	4.64±0.79	4.44±0.92	4.56±0.61	ns
triglycerides (mmol/l)	1.04±0.53 <sup>z</sup>	1.87±0.94 <sup>c</sup>	1.11±0.58	<0.0001
glucose (mmol/l)	8.0±4.1 <sup>c</sup>	9.4±3.7 <sup>c</sup>	4.5±0.6	<0.0001
HbA <sub>1c</sub> (%)	7.56±1.32 <sup>c</sup>	6.91±2.18 <sup>c</sup>	3.60±0.25	<0.0001
albumin/creatinine (g/mol)	1.23 <sup>x</sup> (0.40–3.80)	2.63 <sup>b</sup> (0.43–16.22)	0.47 (0.19–1.14)	0.0038

**Table 1** Characteristics of Type 1 (T1DM) and Type 2 (T2DM) diabetic patients.

Results are means±SD, or means with 1 SD range, in DM duration median with ranges. One-way ANOVA was performed, with p-values in the last column of the table. Statistical significance expressed by Bonferroni's multiple comparison test between DM and control persons: <sup>a</sup>p<0.05, <sup>b</sup>p<0.01, <sup>c</sup>p<0.001; and between T1DM and T2DM: <sup>x</sup>p<0.05, <sup>y</sup>p<0.01, <sup>z</sup>p<0.001

Albuminuria was determined after exclusion of urinary infection in the second morning sample by radioimmunoassay using commercial kits (Immunotech, Czech Republic) and albumin/creatinine ratio was calculated. Positive albuminuria was recognized when albumin/creatinine ratio >3 g/mol creatinine was found. For further analysis decimal logarithm was calculated because of log-normal distribution of the values.

### Statistical analysis

Results of biochemical parameters are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Differences among groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post test analysis. Correlations between variables were assessed by Pearson's coefficient. For statistical analyses, the software "Statistica 9" by StatSoft Inc. was used. The results were considered as statistically significant at  $p < 0.05$ .

### Results

The measured values of biochemical variables in Type 1 and Type 2 diabetic patients are shown in **Table 1, 2**. Serum sRAGE ( $p < 0.01$ ) and EN-RAGE ( $p < 0.001$ ) concentrations were significantly higher in T1DM, whereas in T2DM HMGB1 ( $p < 0.01$ ) and EN-RAGE ( $p < 0.001$ ) were elevated in comparison to controls. The sRAGE concentrations were higher in T1DM with albuminuria  $>3$  g/mol creatinine than in patients with normal albumin

excretion ( $1461 \pm 308$  vs.  $1078 \pm 546$  ng/l,  $p < 0.05$ ).

The same was true in Type 2 diabetic patients ( $1322 \pm 686$  vs.  $877 \pm 389$  ng/l,  $p < 0.01$ ). The sRAGE concentrations were inversely related to body mass index in Type 1 diabetic patients ( $r = -0.47$ ,  $p = 0.01$ ), but not in Type 2 patients ( $r = -0.08$ , NS). Significantly higher concentrations of vWF, MMP2 and VCAM-1 were found in Type 1 and Type 2 diabetic patients than in controls, but no differences in their values were observed between both types of diabetic patients. MMP2 and MMP9 values had a non-normal distribution and were logarithmically transformed before analysis. The influence of gender and age as independent variables on measured variables was not detected. However, diabetes duration positively influenced sRAGE ( $r = 0.43$ ,  $p = 0.01$ ), but neither HMGB1 nor EN-RAGE concentrations in both Type 1 and Type 2 diabetic patients. Type 2 diabetic patients treated with oral agents had shorter diabetes duration ( $8 \pm 6$  vs.  $16 \pm 9$  years,  $p < 0.001$ ) and better diabetes control ( $HbA1c 5.7 \pm 1.2\%$  vs.  $7.9 \pm 2.4\%$ ,  $p < 0.001$ ) as compared to those treated with insulin. The sRAGE concentration was higher in patients treated with insulin than in those on oral agents ( $1145 \pm 637$  vs.  $844 \pm 258$  ng/l,  $p < 0.02$ ). Administration of statin or ACE inhibitor/AT1 blocker had no effect in both types of diabetic patients on sRAGE, its ligands and markers of endothelial activation (vWF or cell adhesion molecules) and therefore all diabetic patients of a given type could be evaluated together. Correlation analysis showed several relationships between biochemical variables (**Table 3**). In T1DM significant positive relationship was found between sRAGE and ICAM-1 ( $r = 0.38$ ,  $p = 0.01$ ) and VCAM-1 ( $r = 0.62$ ,  $p = 0.001$ ). In the same group both HMGB1 ( $r = 0.41$ ,  $p = 0.001$ ) and EN-RAGE ( $r = 0.44$ ,  $p = 0.001$ ) were strongly related to MMP9, whereas sRAGE was related to MMP2 (**Table 3**). In T2DM sRAGE was related to diabetes control expressed by  $HbA1c$  ( $r = 0.38$ ,  $p = 0.002$ ) and to vWF ( $p = 0.35$ ,  $p = 0.005$ ). In this group MMP9 was related to HMGB1 ( $r = 0.26$ ,  $p = 0.03$ ) and EN-RAGE ( $r = 0.47$ ,  $p = 0.002$ ) similarly as described in T1DM. Only mild correlation of CRP with EN-RAGE in T1DM ( $r = 0.317$ ,  $p = 0.034$ ) was observed.

Inverse relationship was observed between MMP2 and MMP9 in both T1DM and T2DM ( $r = -0.602$ ,  $p < 0.002$  and  $r = -0.771$ ,  $p < 0.001$ ). This was not found in healthy control persons. vWF was positively related to sRAGE in T1DM and T2DM ( $p < 0.03$ ), to ICAM in T1DM ( $r = 0.389$ ,  $p < 0.01$ ) and to VCAM in T2DM ( $r = 0.361$ ,  $p < 0.003$ ). Albumin/creatinine ratio correlated with cell adhesion molecules in both types of diabetes and with sRAGE in T2DM ( $r = 0.39$ ,  $p < 0.001$ ).

**Table 2** Biochemical variables of RAGE characteristics and endothelial dysfunction.

	T1DM (n=45)	T2DM (n=66)	Controls (n=43)	ANOVA p-value
sRAGE (ng/l)	$1137 \pm 532^b$	$995 \pm 519$	$824 \pm 309$	0.011
HMGB1 (μg/l)	$2.23 \pm 1.65$	$2.59 \pm 1.96^b$	$1.60 \pm 0.96$	0.011
EN-RAGE (μg/l)	$250 \pm 197^c$	$292 \pm 207^c$	$109 \pm 66$	<0.0001
vWF (μg/l)	$114 \pm 48^a$	$127 \pm 56^c$	$88 \pm 32$	0.0004
MMP2 (μg/l)	$287 \pm 108^c$	$318 \pm 118^c$	$190 \pm 31$	<0.0001
MMP9 (μg/l)	$505 \pm 429$	$476 \pm 427$	$609 \pm 271$	NS
ICAM (μg/l)	$260 \pm 84$	$296 \pm 176^b$	$206 \pm 64$	0.002
VCAM (μg/l)	$915 \pm 450^c$	$848 \pm 342^c$	$365 \pm 70$	<0.0001
P-selectin (μg/l)	$113 \pm 34^a$	$116 \pm 41$	$140 \pm 76$	0.028
E-selectin (μg/l)	$29 \pm 14^{bx}$	$40 \pm 16$	$40 \pm 19$	0.001

Results are means  $\pm$  SD. One-way ANOVA was performed, with p-values in the last column of the table. Statistical significance expressed by Bonferroni's multiple comparison test between DM and control persons: <sup>a</sup> $p < 0.05$ , <sup>b</sup> $p < 0.01$ , <sup>c</sup> $p < 0.001$ ; and between T1DM and T2DM: <sup>x</sup> $p < 0.01$

**Table 3** The correlations between biochemical variables of RAGE characteristics and markers of endothelial dysfunction.

	T1DM			T2DM		
	sRAGE	HMGB1	EN-RAGE	sRAGE	HMGB1	EN-RAGE
HbA <sub>1c</sub>	-0.056 (NS)	-0.204 (NS)	-0.177 (NS)	<b>0.378 (0.002)</b>	0.188 (NS)	0.224 (NS)
Alb./creat.	0.153 (NS)	<b>-0.385 (0.01)</b>	<b>-0.328 (0.02)</b>	<b>0.391 (0.001)</b>	0.105 (NS)	<b>0.271 (0.05)</b>
creatinine	0.066 (NS)	-0.024 (NS)	-0.040 (NS)	<b>0.461 (0.001)</b>	-0.022 (NS)	-0.028 (NS)
CRP	-0.131 (NS)	0.272 (NS)	<b>0.317 (0.034)</b>	0.002 (NS)	0.132 (NS)	0.123 (NS)
MMP2	<b>0.293 (0.05)</b>	-0.068 (NS)	-0.093 (NS)	0.096 (NS)	-0.050 (NS)	<b>-0.261 (0.03)</b>
MMP9	-0.167 (NS)	<b>0.405 (0.005)</b>	<b>0.435 (0.005)</b>	0.115 (NS)	<b>0.257 (0.03)</b>	<b>0.466 (0.002)</b>
vWF	0.225 (NS)	-0.048 (NS)	-0.027 (NS)	<b>0.349 (0.005)</b>	0.036 (NS)	0.107 (NS)
ICAM	<b>0.384 (0.01)</b>	0.025 (NS)	-0.001 (NS)	0.059 (NS)	0.062 (NS)	0.230 (NS)
VCAM	<b>0.620 (0.001)</b>	-0.179 (NS)	-0.237 (NS)	0.126 (NS)	<b>-0.308 (0.01)</b>	-0.104 (NS)
P-selectin	-0.169 (NS)	0.071 (NS)	0.016 (NS)	0.080 (NS)	0.063 (NS)	0.032 (NS)
E-selectin	-0.059 (NS)	0.000 (NS)	-0.061 (NS)	-0.060 (NS)	0.236 (NS)	0.137 (NS)

## Discussion

Present study demonstrates changes in sRAGE and RAGE ligands EN-RAGE and HMGB1 in Type 1 and Type 2 diabetic patients. The mean values of all these parameters were higher in diabetic patients than in controls, although not always significantly. The concentration of sRAGE was higher in both types of diabetic patients with albuminuria >3 g/mol creatinine as compared to those with normal albumin excretion. This was different from esRAGE which was found decreased in T1DM with microalbuminuria (Marcovecchio et al., 2009). But sRAGE and esRAGE are each generated by a distinct mechanism: while sRAGE depends on proteinases releasing extracellular RAGE domain from cellular surface, esRAGE is provided by alternative splicing of *AGER* gene (Raucci et al., 2008). In prospective follow-up study of Type 1 diabetic patients the progression of carotid atherosclerosis was inversely related to esRAGE as well as sRAGE (Katakami et al., 2009). Such difference supports an idea that sRAGE and esRAGE plasma concentrations are rather secondary than of primary origin. It is further supported by our observation of significant positive correlation between sRAGE and cell adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 related to endothelial dysfunction. More advanced vascular changes in diabetes correspond with increased cleavage of RAGE promoting higher plasma concentrations of sRAGE.

In addition, an association of polymorphism (Gly82Ser) in RAGE gene (*AGER*) with circulating sRAGE levels in Korean, Dutch and Czech population and patients with pancreatic cancer was recently published (Gaens et al., 2009; Jang et al., 2007; Krechler et al., 2010). In our study we did not take this polymorphism into account, since the total number of examined subjects was not large enough for such analysis, moreover, this polymorphism is not common within our population. Deglycosylation or Gly82Ser mutation may sensitize RAGE to advanced glycation endproducts and such diabetic patients may be at risk of developing complications (Osawa et al., 2007). Moreover, drug administration has to be taken into account, since certain increase of plasma sRAGE levels was found following pioglitazone (Gul et al., 2010) or atorvastatin (Tam et al., 2010) treatment in Type 2 diabetic patients. In our study we could not prove any difference in serum sRAGE concentrations between Type 2 diabetic patients with or without statin administration.

Another important aspect which needs to be taken into account is the association of sRAGE levels with renal impairment. It has been already reported that decreased renal function expressed by creatinine elevation or decreased glomerular filtration rate (GFR) is associated with higher sRAGE concentrations (Kalousova et al., 2006; Kankova et al., 2008; Koyama and Nishizawa, 2010). It remains to be determined whether the increase in plasma sRAGE in chronic kidney disease is caused by decreased renal function alone or whether sRAGE level is upregulated by chronic inflammatory reaction. The kidney role in sRAGE removal is supposedly important, since a significant decrease in plasma sRAGE was observed after successful kidney transplantation (Kalousova et al., 2007). In our study we have measured the total pool of circulating sRAGE and therefore we cannot discern whether the different variants of sRAGE have some specific connection to renal impairment. We proved positive relationship of serum sRAGE with serum creatinine concentrations and albuminuria in Type 2 but not in Type 1 diabetic patients.

Serum HMGB1 concentrations were found higher in Type 2 diabetic patients with coronary artery disease than in those with-

out coronary impairment (Yan et al., 2009) and, similarly, elevated in patients with heart failure in diabetic and non-diabetic patients (Wang et al., 2011). In an experimental study HMGB1 promoted angiogenesis after ischemia through a VEGF-dependent mechanism (Biscetti et al., 2010). It is supposed that more advanced endothelial cell pathology may be associated with higher levels of circulating RAGE ligands – such relationship was demonstrated especially in T2DM. Increased serum concentrations of RAGE ligands seem to be a consequence of vascular changes and they further stimulate this process by an activated intracellular cascade. We found higher mean serum HMGB1 and EN-RAGE concentrations in both types of diabetic patients but we could not confirm any association with parameters of endothelial dysfunction.

We found significantly increased plasma MMP2 in both Type 1 and Type 2 diabetic patients as compared to healthy controls, whereas MMP9 concentrations were slightly but not significantly decreased compared to normal values. Relationship of MMP2 to sRAGE in Type 1 diabetic patients may support a conjecture that this metalloproteinase but not MMP9 influence sRAGE release. In Type 2 diabetes this relationship was lacking, but more additional factors (diabetes treatment, higher degree of oxidative stress, diabetes control or other not yet recognized) could play a role. In previous studies plasma MMP2 and MMP9 concentrations were found comparable in Type 2 diabetic patients and control subjects (Papazafiroglou et al., 2010). The strong inverse relationship between MMP2 and MMP9 found in our whole cohort of diabetic patients but not in healthy persons was not reported yet. Different activation of both enzymes in patients with developed endothelial dysfunction or vascular changes could be supposed. Both metalloproteinases are active in degradation of extracellular matrix, especially of collagen IV. They participate in neovascularization since angiogenesis needs extracellular matrix degradation. The *in vitro* results showed that MMP2 has a proapoptotic role in the loss of retinal capillary cells in diabetes and that its activity is under regulation of superoxide (Kowluru and Kanwar, 2009). The oxidative stress reduction may ameliorate alterations in retinal MMP2 activities. Similar role of MMPs was proposed in the development of diabetic nephropathy (Thraillkill et al., 2009). There are some limitations of this study. Firstly, soluble RAGE concentration measured with Quantikine immunoassay reflects the total pool of circulating RAGE – that is both sRAGE and esRAGE. Another ELISA assay would be necessary to measure only the esRAGE fraction. On the other hand, it was reported previously, that there was a strong correlation between sRAGE and esRAGE concentrations (Kalousova et al., 2007). Secondly, sRAGE levels are modified in the presence of microalbuminuria or decreased renal functions as discussed above and patients with such complications were not excluded from this study although severe renal impairment was not present in any of our patients. Thirdly, some of the patients with diabetes were simultaneously treated with different drugs (insulin, statin, oral hypoglycemic agent, ACEI inhibitors), which could also influence the levels of sRAGE, but it was not possible to discontinue their treatment. However, this reflects the present complex treatment of diabetic patients and our results may stimulate further investigation. Finally, in the present study we did not measure the oxidative stress parameters (e.g., plasma malondialdehyde or scavenger enzymes such as superoxide dismutase) as we did in earlier studies (Skrha et al., 2007; Skrha et al., 2004). This may

limit explanation of the influence of some causative factors on measured variables.

We conclude that diabetes mellitus is associated with activated inflammatory system by which endothelial dysfunction develops. It can be demonstrated by different markers such as vWF, VCAM-1, ICAM-1 and others. Similarly, both sRAGE and RAGE ligands are released into the blood and their plasma concentration increases. However, the total levels also depend on other factors such as proteinases (e.g., MMPs), which may modify actual results (Yan et al., 2009). We could demonstrate the relationship of sRAGE and RAGE ligands to markers of endothelial dysfunction and metalloproteinases in diabetic patients. The understanding of the whole scenario with timing of changes in biochemical indicators will need follow-up studies.

## Acknowledgements

The authors thank to Mrs. Marcela Jarolímková and Mrs. Dita Hudcová for technical assistance. The study was supported by research project MSM 0021620807 and by the grant SVV-2011-262513.

**Conflict of Interest:** None.

## References

- 1 Bierhaus A, Nawroth PP. Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia* 2009; 52: 2251–2263
- 2 Biscetti F, Straface G, De Cristofaro R et al. High-mobility group box-1 protein promotes angiogenesis after peripheral ischemia in diabetic mice through a VEGF-dependent mechanism. *Diabetes* 2010; 59: 1496–1505
- 3 Gaens KHJ, Ferreira I, van der Kallen CJH et al. Association of polymorphism in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene with circulating RAGE levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 5174–5180
- 4 Gul OO, Tuncel E, Yilmaz Y et al. Comparative effects of pioglitazone and rosiglitazone on plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products in type 2 diabetes mellitus patients. *Metabol Clin Exp* 2010; 59: 64–69
- 5 Hofmann MA, Drury S, Fu C et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 1999; 97: 889–901
- 6 Jang Y, Kim JY, Kang SM et al. 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. *Metabol Clin Exp* 2007; 56: 199–205
- 7 Kadoglou NP, Daskalopoulou SS, Perrea D et al. Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications. *Angiology* 2005; 56: 173–189
- 8 Kalousova M, Bartosova K, Zima T et al. Pregnancy-associated plasma protein A and soluble receptor for advanced glycation end products after kidney transplantation. *Kidney Blood Press R* 2007; 30: 31–37
- 9 Kalousova M, Hodkova M, Kazderova M et al. Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function. *Am J Kidney Dis* 2006; 47: 406–411
- 10 Kalousova M, Jachymova M, Mestek O et al. Receptor for advanced glycation end products – soluble form and gene polymorphisms in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 2020–2026
- 11 Kankova K, Kalousova M, Hertlova M et al. Soluble RAGE, diabetic nephropathy and genetic variability in the AGER gene. *Arch Physiol Biochem* 2008; 114: 111–119
- 12 Katakami N, Matsuhisa M, Kaneto H et al. Serum endogenous secretory RAGE level is an independent risk factor for the progression of carotid atherosclerosis in type 1 diabetes. *Atherosclerosis* 2009; 204: 288–292
- 13 Katakami N, Matsuhisa M, Kaneto H et al. Endogenous secretory RAGE but not soluble RAGE is associated with carotid atherosclerosis in type 1 diabetes patients. *Diab Vasc Dis Re* 2008; 5: 190–197
- 14 Kosaki A, Hasegawa T, Kimura T et al. Increased plasma S100A12 (EN-RAGE) levels in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocr Metab* 2004; 89: 5423–5428
- 15 Kowluru RA, Kanwar M. Oxidative stress and the development of diabetic retinopathy: Contributory role of matrix metalloproteinase-2. *Free Radic Biol Med* 2009; 46: 1677–1685
- 16 Koyama H, Nishizawa Y. AGEs/RAGE in CKD: irreversible metabolic memory road toward CVD? *Eur J Clin Invest* 2010; 40: 623–635
- 17 Krechler T, Jachymova M, Mestek O et al. Soluble receptor for advanced glycation end-products (sRAGE) and polymorphisms of RAGE and glyoxalase I genes in patients with pancreas cancer. *Clin Biochem* 2010; 43: 882–886
- 18 Marcovecchio ML, Giannini C, Dalton RN et al. Reduced endogenous secretory receptor for advanced glycation end products (esRAGE) in young people with Type 1 diabetes developing microalbuminuria. *Diabetic Med* 2009; 26: 815–819
- 19 Nawroth PP, Rudofsky G, Humpert P. Have we understood diabetes? New tasks for diagnosis and therapy. *Exp Clin Endocrinol Diabet* 2010; 118: 1–3
- 20 Osawa M, Yamamoto Y, Munesue S et al. De-N-glycosylation or G82S mutation of RAGE sensitizes its interaction with advanced glycation endproducts. *BBA-Gen Subjects* 2007; 1770: 1468–1474
- 21 Papazafiropoulou A, Perrea D, Moysakis I et al. Plasma levels of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 are not associated with arterial stiffness in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complicat* 2010; 24: 20–27
- 22 Raucci A, Cugusi S, Antonelli A et al. 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 J* 2008; 22: 3716–3727
- 23 Schmidt AM, Hori O, Chen JX et al. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 1995; 96: 1395–1403
- 24 Skrha J, Prazny M, Hilgertova J et al. Oxidative stress and endothelium influenced by metformin in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63: 1107–1114
- 25 Skrha J, Stulc T, Hilgertova J et al. Effect of simvastatin and fenofibrate on endothelium in Type 2 diabetes. *Eur J Pharmacol* 2004; 493: 183–189
- 26 Sparvero LJ, Asufu-Adjei D, Kang R et al. RAGE (receptor for advanced glycation endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *J Transl Med* 2009; 7
- 27 Tam HL, Shiu SWM, Wong Y et al. Effects of atorvastatin on serum soluble receptors for advanced glycation end-products in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2010; 209: 173–177
- 28 Thraillkill KM, Bunn RC, Fowlkes JL. Matrix metalloproteinases: their potential role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Endocrine* 2009; 35: 1–10
- 29 Vazzana N, Santilli F, Cuccurullo C et al. Soluble forms of RAGE in internal medicine. *Intern Emerg Med* 2009; 4: 389–401
- 30 Wang LJ, Lu L, Zhang FR et al. Increased serum high-mobility group box-1 and cleaved receptor for advanced glycation endproducts levels and decreased endogenous secretory receptor for advanced glycation endproducts levels in diabetic and non-diabetic patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 2011; 13: 440–449
- 31 Wautier JL, Grossin N. sRAGE and esRAGE. *Diabetes Metab* 2008; 34: 631
- 32 Yan SF, Du Yan S, Ramasamy R et al. Tempering the wrath of RAGE: An emerging therapeutic strategy against diabetic complications, neurodegeneration, and inflammation. *Ann Med* 2009; 41: 408–422
- 33 Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE) and its ligands—cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response. *J Mol Med* 2009; 87: 235–247
- 34 Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochem Pharmacol* 2010; 79: 1379–1386
- 35 Yan XX, Lu L, Peng WH et al. Increased serum HMGB1 level is associated with coronary artery disease in nondiabetic and type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* 2009; 205: 544–548
- 36 Yao D, Brownlee M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes* 2010; 59: 249–255

# Fructosamine 3-Kinase and Glyoxalase I Polymorphisms and Their Association With Soluble RAGE and Adhesion Molecules in Diabetes

J. ŠKRHA Jr.<sup>1,2</sup>, A. MURAVSKÁ<sup>2</sup>, M. FLEKAČ<sup>1</sup>, E. HOROVÁ<sup>1</sup>, J. NOVÁK<sup>1</sup>,  
 A. NOVOTNÝ<sup>1</sup>, M. PRÁZNY<sup>1</sup>, J. ŠKRHA<sup>1</sup>, J. KVASNIČKA<sup>2</sup>, L. LANDOVÁ<sup>2</sup>,  
 M. JÁCHYMOVÁ<sup>2</sup>, T. ZIMA<sup>2</sup>, M. KALOUSOVÁ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Third Department of Internal Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital, Prague, Czech Republic, <sup>2</sup>Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital, Prague, Czech Republic

Received March 20, 2014

Accepted March 26, 2014

## Summary

Advanced glycation end-products (AGEs) are key players in pathogenesis of long-term vascular diabetes complications. Several enzymes such as fructosamine 3-kinase (FN3K) and glyoxalase I (GLO I) are crucial in preventing glycation processes. The aim of our study was to evaluate an association of *FN3K* (rs1056534, rs3848403) and *GLO1* rs4746 polymorphisms with parameters of endothelial dysfunction and soluble receptor for AGEs (sRAGE) in 595 diabetic and non-diabetic subjects. Genotypic and allelic frequencies of mentioned polymorphisms did not differ between subgroups. In diabetic patients significant differences were observed in sRAGE concentrations according to their rs1056534 and rs3848403 genotype. While GG and CG genotypes of rs1056534 with mutated G allele were associated with significant decrease of sRAGE (GG: 1055±458 and CG: 983±363 vs. CC: 1796±987 ng/l, p<0.0001), in rs3848403 polymorphism TT genotype with mutated T allele was related with significant sRAGE increase (TT: 1365±852 vs. CT: 1016±401 and CC: 1087±508 ng/l, p=0.05). Significant differences in adhesion molecules were observed in genotype subgroups of *GLO1* rs4746 polymorphism. In conclusion, this is the first study describing significant relationship of *FN3K* (rs1056534) and (rs3848403) polymorphisms with concentration of sRAGE in patients with diabetes.

## Key words

Fructosamine 3-kinase • Glyoxalase I • Diabetes • sRAGE • Adhesion molecules

## Corresponding author

J. Škrha Jr., Third Department of Internal Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital, U Nemocnice 1, 128 08 Prague 2, Czech Republic.  
E-mail: jan.skrha@seznam.cz

## Introduction

Advanced glycation end-products (AGEs) are key players in the pathogenesis of long-term vascular complications in patients with diabetes (Brownlee 2005, Genuth *et al.* 2005, Vlassara and Striker 2013). AGEs originate by non-enzymatic glycation of proteins, forming cross-links with collagen and other proteins, resulting in decreased vessel elasticity (Zieman *et al.* 2007). One of the most potent precursor is methylglyoxal (MG), which causes irreversible effects on protein structure and function (Silva *et al.* 2013). Another important precursor for excessive glycation is fructosamine (Popova *et al.* 2010). Apart from endogenously produced AGEs, the human body is also exposed to oral AGEs in food, which also further promotes insulin resistance and diabetes development (Cai *et al.* 2012). In this respect, deglycation processes are essential for deceleration of vascular damage progression. Two enzymatic systems rank among the most important protective factors – fructosamine 3-kinase and glyoxalase system.

Fructosamine 3-kinase (FN3K) is an intracellular enzyme responsible for deglycation of proteins. Higher

expression of this enzyme was observed in increased-glycation-prone tissues, such as heart, nerves and kidneys (Mohan *et al.* 2010). Phosphorylation of fructosamine by FN3K leads to production of unstable fructosamine 3-phosphate, which further decomposes to 3-deoxyglucosone and phosphate, leading to deglycation of proteins (Delpierre and Van Schaftingen 2003). On the other hand, 3-deoxyglucosone is a potent precursor for AGEs formation, elevated in diabetic patients with microangiopathy (Kusunoki *et al.* 2003). The gene for FN3K is located on chromosome 17q25. So far, various polymorphisms of the gene have been described, some of them having impact on FN3K activity in human erythrocytes (Delpierre *et al.* 2006).

Glyoxalase I catalyzes acyclic alpha-oxoaldehydes conversion to hydroxyacylglutathione derivatives and thus prevents glycation reactions mediated by methylglyoxal, glyoxal and other alpha-oxoaldehydes. Decreased glyoxalase I activity caused by aging and oxidative stress results in increased glycation and tissue damage (Song and Schmidt 2012). Moreover, glyoxalase I deficiency is associated with an unusual level of advanced glycation end products in a hemodialysis patient (Miyata *et al.* 2001), while knockdown of glyoxalase I even mimics diabetic nephropathy in nondiabetic mice (Giacco *et al.* 2014). The gene encoding GLO I is located on chromosome 6p21.2. Several polymorphisms of *GLO1* were studied, most of the data describing *GLO1* rs4746 polymorphism, where wild type A allele is substituted by mutated C allele. Such polymorphism is associated with reduced activity of the enzyme, accumulation of its substrate methylglyoxal and elevation of RAGE in patients with autism (Barua *et al.* 2011). Similarly, *GLO1* rs4746 polymorphism was associated with elevated sRAGE levels in hemodialysis patients (Kalousova *et al.* 2008).

Higher concentration of different AGEs leads to increased binding to receptor for AGEs (RAGE) with subsequent acceleration of chronic inflammation performed by enhanced expression of genes for growth factors or cytokines (IFN $\gamma$ , PDGF, TNF $\alpha$ , IL-1) and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, P-selectin, E-selectin). The involvement of RAGE and soluble RAGE (sRAGE) in the pathophysiology of diabetes angiopathy has been reported previously (Yan *et al.* 2007, Lindsey *et al.* 2009, Skrha *et al.* 2012).

The aim of our study was to investigate polymorphisms of genes encoding important enzymes involved in the deglycation systems (*FN3K* rs3848403,

*FN3K* rs1056534 and *GLO1* rs4746) and their relationship to the development of chronic micro- and macrovascular damage in diabetes. Since the involvement of RAGE activation and endothelial dysfunction in the development of diabetic vascular damage seems to be of great importance (Roberts and Porter 2013), we also analyzed concentrations of sRAGE and markers of endothelial dysfunction in our patients.

## Patients and Methods

### Subjects

A total of 595 Caucasian subjects were enrolled in this study (311 men and 284 women), from those 126 healthy controls, 129 patients with Type 1 diabetes (T1DM) and 340 patients with Type 2 diabetes (T2DM). Their characteristics are shown in Table 1. All patients with severe hypertension, neurodegenerative disorders, known malignancy, or infections, which could significantly influence laboratory variables, were excluded from the study. The incidence of known microvascular and macrovascular complications among the subjects and basic pharmacological treatment of the patients is presented in Table 2.

The study was performed in accordance with principles of the Declaration of Helsinki and was approved by local Ethics Committee of the General University Hospital and First Faculty of Medicine. All examined persons gave informed consent prior to being enrolled into the study.

### Biochemical methods

Fasting blood samples were collected between 7.00 and 8.00 AM from the cubital vein. Routine biochemical parameters were determined in fresh samples, whereas special biochemical analyses were done in serum frozen at -80 °C until the assay measurement. Routine biochemical parameters including urea, creatinine, transaminases, alkaline phosphatase,  $\gamma$ -glutamyltransferase, total cholesterol, and triglycerides were determined in central laboratory on Modular Roche analyzer. Fasting plasma glucose was determined by glucose oxidase method on glucose analyzer Super GLAmbulance (Dr. Müller Gerätebau, Freital, Germany); glycated hemoglobin HbA<sub>1c</sub> was measured by HPLC on Variant II (Biorad, France) and expressed according to IFCC (normal values are 28-40 mmol/mol). Albuminuria was determined after exclusion of urinary infection by radioimmunoassay using commercial kits (Immunotech,

Czech Republic) and urinary albumin/creatinine ratio (ACR) was calculated. Presence of nephropathy was characterized by positive (micro)albuminuria, which was recognized by albumin/creatinine ratio  $>3$  g/mol creatinine. Logarithmically transformed data were used for further analysis, because lognormal distribution of the values was found. Renal functions were evaluated by estimated glomerular filtration rate (eGFR) calculated by MDRD formula (Levey *et al.* 1999).

In 126 subjects (50 T1DM, 52 T2DM and 24 healthy controls; serum of other subjects was no more available) analysis of sRAGE and markers of endothelial activation was performed. Serum concentration of soluble RAGE was measured according to the manufacturer's protocol using sandwich ELISA (Quantikine, RD Systems, Minneapolis, MN, USA). In this assay, the plate is coated with a monoclonal antibody against RAGE while a polyclonal antibody is used for detection. This assay measures both C-truncated RAGE that has been cleaved from the cell surface, and esRAGE as well (Yonekura *et al.* 2003). Endothelial dysfunction was evaluated by serum concentrations of specific markers, such as adhesion molecules (ICAM, VCAM, E-selectin, and P-selectin) and vWF. Cell adhesion molecules Human sP-selectin/CD62P, Human sE-selectin/CD62E, Human sICAM-1/CD54, and Human sVCAM-1 were estimated by ELISA kits manufactured by RD System Europe (Abingdon, UK), von Willebrand factor (vWF) was determined by Corgenix (Broomfield, USA).

#### *Molecular genotyping*

For DNA analysis blood was collected into EDTA-tubes, centrifuged and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  until isolation. Genomic DNA was prepared from leukocytes by sodium dodecylsulphate (SDS) lysis by ammonium acetate extraction and ethanol precipitation. Isolated DNA was stored at  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### *FN3K polymorphisms*

Two SNPs of *FN3K* gene were studied for their potential functional effect on enzyme activity (rs1056534 (Ser300Ser, S300S) and rs3848403 (C/T intron variant). DNA analysis was performed using RealTime PCR and Taqman genotyping method for allelic discrimination. For quality control, the subjects were distributed randomly across the plates. Negative controls (Universal-mixture blanks) were included onto each plate. The genotyping success rate was 95 % (range 91 to 98 %).

#### *GLOI polymorphism*

The *GLOI* rs4746 (Glu111Ala, A419C) polymorphism of the glyoxalase I gene was determined by PCR-RFLP method as described in detail previously (Kalousova *et al.* 2008, Germanova *et al.* 2009). Restriction analysis was performed by restriction nuclease BsmAI overnight at  $37^{\circ}\text{C}$ . Fragments of 143 bp and 60 bp for wild type allele 419A and 203 bp for mutated allele 419C were produced after digestion.

#### *Statistical analysis*

Results of biochemical parameters were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or as median (interquartile range). Differences between the groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by *post-hoc* test analysis. The allelic frequencies for each polymorphism were calculated in all groups.  $\chi^2$  test was used to compare the qualitative data. Moreover, Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) within the groups was estimated by  $\chi^2$  test as well. Results were considered statistically significant for p-values  $<0.05$ .

## Results

Clinical characteristics of 595 subjects enrolled within this study are shown in Table 1. Diabetes control did not differ significantly between patients with T1DM and T2DM (FPG:  $8.7 \pm 3.6$  vs.  $8.7 \pm 3.3$  mmol/l, ns; HbA<sub>1c</sub>:  $69 \pm 14$  vs.  $64 \pm 21$  mmol/mol, ns), although the duration of the disease was longer in T1DM (16 vs. 11 years,  $p < 0.001$ ). Incidence of both microvascular and macrovascular complications in patients with diabetes is shown in Table 2, as well as the usage of antidiabetic, antihypertensive and hypolipidemic drugs.

In both patients with T1DM, T2DM and controls the genotype frequencies of *FN3K* and *GLOI* polymorphisms followed the expected frequencies according to Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). We did not find any significant differences of genotype and allelic frequencies of *FN3K* (rs1056534), *FN3K* (rs3848403) and *GLOI* (rs4746) polymorphisms within the studied groups (Table 3). Similarly, we did not observe differences of genotype and allelic frequencies in studied polymorphisms among patients with or without developed microvascular (nephropathy, neuropathy, retinopathy) and macrovascular (ischemic heart disease, chronic limb ischemia, stroke) complications.

**Table 1.** Basic clinical characteristics of studied subjects.

	T1DM (n=129)	T2DM (n=340)	Controls (n=126)	ANOVA
Age (years)	46 (20-80)	63 (26-93)	45 (18-91)	p<0.0001
Duration of DM (years)	16 (1-57)	11 (1-44)	-	
Sex (% males)	58	52	48	ns
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.0±3.1 <sup>z</sup>	29.5±5.9 <sup>c</sup>	25.4±4.8	p<0.005
SBP (mm Hg)	132±13	138±18	129±14	ns
DBP (mm Hg)	81±10	79±11	77±9	ns
Creatinine (μmol/l)	83.2±38.4 <sup>x</sup>	95.7±52.5 <sup>b</sup>	78.0±22.3	p<0.05
Cholesterol (mmol/l)	4.63±0.77	4.44±0.92	4.52±0.82	ns
Triglycerides (mmol/l)	1.03±0.49 <sup>z</sup>	1.79±1.17 <sup>c</sup>	1.05±0.61	p<0.0001
FPG (mmol/l)	8.7±3.6 <sup>c</sup>	8.7±3.3 <sup>c</sup>	4.4±0.8	p<0.0001
HbA <sub>1c</sub> (mmol/mol, IFCC)	69±14 <sup>c</sup>	64±21 <sup>c</sup>	37±13	p<0.0001
sRAGE (ng/l)	1083±420 <sup>a</sup>	1119±619 <sup>a</sup>	785±314	p<0.05
Albumin/creatinine (g/mol)	1.22 <sup>bz</sup> (0.1-22.5)	7.53 <sup>c</sup> (0.2-294.3)	0.48 (0.1-1.8)	p<0.0001

Results are means ± SD, or means with 1 SD range, in DM duration median with ranges. One-way ANOVA was performed, with p values in the last column of the table. Statistical significance expressed by LSD multiple comparison *post-hoc* test between DM and control persons: <sup>a</sup>p<0.05, <sup>b</sup>p<0.01, <sup>c</sup>p<0.001, and between T1DM and T2DM: <sup>x</sup>p<0.05, <sup>y</sup>p<0.01, <sup>z</sup>p<0.001.

**Table 2.** Incidence of diabetic complications and frequency of antidiabetic/hypolipidemic/antihypertensive drugs usage.

	T1DM (n=129)	T2DM (n=340)	Controls (n=126)	χ <sup>2</sup> test
Nephropathy (%)	27	41	16	p<0.0001
Retinopathy (%)	31	17	0	p<0.005
Neuropathy (%)	13	19	0	p<0.005
Ischemic heart disease (%)	5	26	2	p<0.0001
Chronic limb ischemia (%)	3	11	0	p<0.05
Stroke (%)	3	8	2	ns
Insulin (%)	100	55	0	p<0.0001
OAD (%)	5	80	0	p<0.0001
Statin (%)	25	62	20	p<0.001
ACEI/ARB (%)	41	76	29	p<0.001

Regarding biochemical parameters, significant differences were observed in sRAGE concentrations of diabetic patients according to their *FN3K* (rs1056534) and *FN3K* (rs3848403) genotype (Table 4). While GG and CG genotypes of *FN3K* (rs1056534) polymorphism with mutated G allele were associated with significant decrease of sRAGE concentration (GG: 1055±458 and CG: 983±363 vs. CC: 1796±987 ng/l; p<0.0001), in

*FN3K* (rs3848403) polymorphism TT genotype with mutated T allele was related with significant sRAGE increase (TT: 1365±852 vs. CT: 1016±401 and CC: 1087±508 ng/l; p=0.05).

Significant differences in markers of endothelial activation were observed in genotype subgroups of *GLO1* (rs4746) polymorphism, while that was not seen in both *FN3K* polymorphisms (Table 5).

**Table 3.** Genotype and allelic frequencies in patients with T1DM, T2DM and controls.

		T1DM (n=129)	T2DM (n=340)	Controls (n=126)	$\chi^2$ test
<i>FN3K</i> (rs1056534)	Alleles (%)	C G	36 64	34 66	ns
	Genotypes (%)	CC GG CG	15 44 41	13 44 43	
	Alleles (%)	C T	44 56	46 54	ns
	Genotypes (%)	CC TT CT	18 29 53	21 30 49	
	Alleles (%)	C A	46 54	49 51	ns
	Genotypes (%)	AA CC AC	32 24 44	28 27 45	
<i>GLOI</i> (rs4746)	Alleles (%)	C A	46 54	49 51	ns
	Genotypes (%)	AA CC AC	32 24 44	32 28 41	
	Alleles (%)	C A	46 54	49 51	
	Genotypes (%)	AA CC AC	32 24 44	32 28 41	ns
	Alleles (%)	C A	46 54	49 51	
	Genotypes (%)	AA CC AC	32 24 44	32 28 41	

**Table 4.** sRAGE concentration in diabetic patients and controls in respect of their genotype.

sRAGE (ng/l)	Diabetes (n=102)	Controls (n=24)
<i>FN3K</i> (rs1056534)	<b>CC</b>	1796 ± 987
	<b>GG</b>	1055 ± 458
	<b>CG</b>	983 ± 363
	<b>ANOVA</b>	<b>p&lt;0.0001</b>
<i>FN3K</i> (rs3848403)	<b>CC</b>	1087 ± 508
	<b>TT</b>	1365 ± 852
	<b>CT</b>	1016 ± 401
	<b>ANOVA</b>	<b>p=0.05</b>
<i>GLOI</i> (rs4746)	<b>AA</b>	1164 ± 601
	<b>CC</b>	1035 ± 579
	<b>AC</b>	1104 ± 449
	<b>ANOVA</b>	ns

## Discussion

This is the first study describing significant relationship of *FN3K* (rs1056534) and (rs3848403) polymorphisms with concentration of sRAGE in patients

with diabetes. While mutation in rs1056534 relates to lower sRAGE, mutation in rs3848403 is associated with higher sRAGE. It is still controversial, how to interpret the sRAGE level. Patients with expressed vascular damage in diabetes have higher sRAGE concentration (El-Mesallamy *et al.* 2011). Similar results were also observed in patients with decreased renal function (Kalousova *et al.* 2006, Skrha *et al.* 2012). On the other hand, sRAGE could be also a protective factor against oxidative stress and endothelial dysfunction in atherosclerosis (Santilli *et al.* 2007). There are inconsistent results regarding sRAGE as a marker of future chronic disease risk and mortality (Kalousova *et al.* 2007, Selvin *et al.* 2013). One plausible explanation suggests, that many studies did not distinguish total sRAGE vs. esRAGE components in the experiments, and therefore there are such diverse results across the studies (Daffu *et al.* 2013). In our study, the total pool of soluble RAGE with Quantikine immunoassay was measured and therefore we cannot discern whether the different variants of sRAGE (C-truncated RAGE or esRAGE) have the association to *FN3K* polymorphisms. However, strong correlation of sRAGE and esRAGE in chronic hemodialysis patients ( $r=0.95$ ,  $P<0.001$ ) was reported previously (Kalousova *et al.* 2007) and both sRAGE and

**Table 5.** Adhesion molecules concentration in patients with diabetes in respect of their *GLO1* (rs4746) genotype.

<i>GLO1</i> (rs4746)	T1DM (n=50)			<i>ANOVA</i>	T2DM (n=52)			<i>ANOVA</i>
	AA	CC	AC		AA	CC	AC	
<i>ICAM</i> ( $\mu\text{g/l}$ )	279 ± 65	223 ± 47	213 ± 56	p<0.005	281 ± 57	271 ± 102	274 ± 95	ns
<i>VCAM</i> ( $\mu\text{g/l}$ )	884 ± 308	839 ± 298	849 ± 237	ns	719 ± 314	1219 ± 426	927 ± 296	p<0.01
<i>P-selectin</i> ( $\mu\text{g/l}$ )	114 ± 41	78 ± 33	85 ± 39	p<0.05	114 ± 48	109 ± 46	110 ± 45	ns
<i>E-selectin</i> ( $\mu\text{g/l}$ )	29 ± 11	24 ± 13	32 ± 13	ns	51 ± 10	40 ± 25	34 ± 12	p<0.05

esRAGE increase in oxidative stress (Piarulli *et al.* 2013).

We observed significant differences in markers of endothelial activation in genotype subgroups of *GLO1* (rs4746) polymorphism in patients with diabetes. The results are though uneasy to interpret, since patients with mutated C allele had significantly reduced concentration of ICAM and P-selectin in case of T1DM, and similarly lower concentration of E-selectin in T2DM. On the other hand, significant increase in VCAM concentration was observed in the same genotypes of T2DM. To the best of our knowledge, such data have not been published yet. It is though plausible, that the concentrations of adhesion molecules are apart from *GLO1* genotype dependent on many other and dynamic factors, such as oxidative stress, stage of vascular impairment and others (Urso and Caimi 2011, Ugurlu *et al.* 2013).

The absence of significant differences in genotype and allelic frequencies of *GLO1* (rs4746) polymorphism was reported previously in patients with breast cancer (Germanova *et al.* 2009), but not in both Type 1 and Type 2 diabetes. We confirmed lack of significant differences in *FN3K* (rs1056534) and *FN3K* (rs3848403) genotype and allelic frequencies in patients with diabetes and healthy controls as reported previously (Mosca *et al.* 2011). Moreover, we did not observe differences of genotype and allelic frequencies in studied polymorphisms among patients with/without diabetic vascular complications. Similar results were presented in the past (Engelen *et al.* 2009, Mohas *et al.* 2010, Tanhäuserová *et al.* 2014). On the other hand, significantly higher prevalence of cardiovascular disease and peripheral vascular disease in CC genotype of *GLO1* (rs4746) polymorphism in hemodialysis patients was observed (Kalousová *et al.* 2008). Probably, there are also other molecular mechanisms impacting gene expression and activity of enzymes involved in deglycation systems, since diabetes vascular disease is not straightforward

dependent on metabolic control (Rabbani and Thornalley 2011). Indeed, variations in copy number variants (CNV) in *GLO1* gene are associated with differences in GLO I expression and function (Williams *et al.* 2009).

There are some limitations of this study. Firstly, the total number of subjects enrolled within the study is not large enough for in-depth association analyses; moreover the number of subjects with special biochemical assessment of sRAGE and adhesion molecules was even smaller. Finally, we did not measured the activity of FN3K and GLO I, since the process described previously (Allen *et al.* 1993, Delpierre *et al.* 2006) was not easily practicable.

In conclusion, we demonstrate for the first time the association of rs1056534 and rs3848403 of fructosamine 3-kinase gene with sRAGE in patients with diabetes. In the same cohort, we found significant association of *GLO1* (rs4746) polymorphism with markers of endothelial activation, although precise explanation of such relation is uneasy to submit and larger studies will be necessary for better understanding.

## Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

## Acknowledgements

The authors thank Mrs. Hudcová, Mrs. Pourová, Mrs. Němcová and Mrs. Řeháková for the technical assistance. Supported by grants GAUK 623312, SVV 260032-2014 and by Research Project of Charles University Prvouk P25.

## Abbreviations

AGEs – advanced glycation end-products, FN3K – fructosamine 3-kinase, GLO I – glyoxalase I, sRAGE – soluble receptor for advanced glycation end-products, vWF – von Willebrand factor, ICAM – intercellular

adhesion molecule, VCAM – vascular cell adhesion molecule, T1DM – Type 1 diabetes, T2DM – Type 2 diabetes, FPG – fasting plasma glucose, HbA<sub>1c</sub> – glycated hemoglobin, BMI – body mass index, SBP – systolic

blood pressure, DBP – diastolic blood pressure, OAD – oral antidiabetic drugs, ACEI/ARB – angiotensin-converting enzyme inhibitors/angiotensin receptor blockers.

## References

- ALLEN RE, LO TWC, THORNALLEY PJ: A simplified method for the purification of human red-blood-cell glyoxalase. I. Characteristics, immunoblotting, and inhibitor studies. *J Prot Chem* **12**: 111-119, 1993.
- BARUA M, JENKINS EC, CHEN WQ, KUIZON S, PULLARKAT RK, JUNAID MA: Glyoxalase I polymorphism rs2736654 causing the Ala111Glu substitution modulates enzyme activity-implications for autism. *Autism Res* **4**: 262-270, 2011.
- BROWNLEE M: The pathobiology of diabetic complications – a unifying mechanism. *Diabetes* **54**: 1615-1625, 2005.
- CAI WJ, RAMDAS M, ZHU L, CHEN X, STRIKER GE, VLASSARA H: Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1. *Proc Nat Acad Sci USA* **109**: 15888-15893, 2012.
- DAFFU G, DEL POZO CH, O'SHEA KM, ANANTHAKRISHNAN R, RAMASAMY R, SCHMIDT AM: Radical roles for RAGE in the pathogenesis of oxidative stress in cardiovascular diseases and beyond. *Int J Mol Sci* **14**: 19891-19910, 2013.
- DELPIERRE G, VAN SCHAFTINGEN E: Fructosamine 3-kinase, an enzyme involved in protein deglycation. *Biochem Soc Trans* **31**: 1354-1357, 2003.
- DELPIERRE G, VEIGA-DA-CUNHA M, VERTOMMEN D, BUYSSCHAERT M, VAN SCHAFTINGEN E: Variability in erythrocyte fructosamine 3-kinase activity in humans correlates with polymorphisms in the FN3K gene and impacts on haemoglobin glycation at specific sites. *Diabetes Metab* **32**: 31-39, 2006.
- EL-MESALLAMY HO, HAMDY NM, EZZAT OA, REDA AM: Levels of soluble advanced glycation end product-receptors and other soluble serum markers as indicators of diabetic neuropathy in the foot. *J Invest Med* **59**: 1233-1238, 2011.
- ENGELEN L, FERREIRA I, BROUWERS O, HENRY RMA, DEKKER JM, NIJPELS G, HEINE RJ, VAN GREEVENBROEK MMJ, VAN DER KALLEN CJH, BLAAK EE, FESKENS EJM, TEN CATE H, STEHOUWER CDA, SCHALKWIJK CG: Polymorphisms in glyoxalase 1 gene are not associated with vascular complications: the Hoorn and CoDAM studies. *J Hypertens* **27**: 1399-1403, 2009.
- GENUTH S, SUN WJ, CLEARY P, SELL DR, DAHMS W, MALONE J, SIVITZ W, MONNIER VM, ANCILLARY DSC: 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* **54**: 3103-3111, 2005.
- GERMANOVA A, TESAROVA P, JACHYMOVA M, ZVARA K, ZIMA T, KALOUSOVA M: Glyoxalase I Glu111Ala polymorphism in patients with breast cancer. *Cancer Invest* **27**: 655-660, 2009.
- GIACCO F, DU X, D'AGATI VD, MILNE R, SUI G, GEOFFRION M, BROWNLEE M: Knockdown of glyoxalase 1 mimics diabetic nephropathy in nondiabetic mice. *Diabetes* **63**: 291-299, 2014.
- KALOUSOVA M, HODKOVA M, KAZDEROVA M, FIALOVA J, TESAR V, DUSILOVA-SULKHOVA S, ZIMA T: Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function. *Am J Kidney Dis* **47**: 406-411, 2006.
- KALOUSOVA M, JACHYMOVA M, MESTEK O, HODKOVA M, KAZDEROVA M, TESAR V, ZIMA T: Receptor for advanced glycation end products – soluble form and gene polymorphisms in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* **22**: 2020-2026, 2007.
- KALOUSOVA M, GERMANOVA A, JACHYMOVA M, MESTEK O, TESAK V, 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.

- KUSUNOKI H, MIYATA S, OHARA T, LIU BF, URIUHARA A, KOJIMA H, SUZUKI K, MIYAZAKI H, YAMASHITA Y, INABA K, KASUGA M: Relation between serum 3-deoxyglucosone and development of diabetic microangiopathy. *Diabetes Care* **26**: 1889-1894, 2003.
- LEVEY AS, BOSCH JP, LEWIS JB, GREENE T, ROGERS N, 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.
- LINDSEY JB, CIPOLLONE F, ABDULLAH SM, MC GUIRE DK: Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): cardiovascular implications. *Diabetes Vasc Dis Res* **6**: 7-14, 2009.
- MIYATA T, DE STRIHOU CV, IMASAWA T, YOSHINO A, UEDA Y, OGURA H, KOMINAMI K, ONOGI H, INAGI R, NANGAKU M, KUROKAWA K: Glyoxalase I deficiency is associated with an unusual level of advanced glycation end products in a hemodialysis patient. *Kidney Int* **60**: 2351-2359, 2001.
- MOHAS M, KISFALI P, BARICZA E, MEREI A, MAASZ A, CSEH J, MIKOLAS E, SZIJARTO IA, MELEGH B, WITTMANN I: A polymorphism within the fructosamine-3-kinase gene is associated with HbA(1c) levels and the onset of type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diab* **118**: 209-212, 2010.
- MOSCA L, PENCO S, PATROSSO MC, MAROCCHI A, LAPOLLA A, SARTORE G, CHILELLI NC, PALEARI R, MOSCA A: Genetic variability of the fructosamine 3-kinase gene in diabetic patients. *Clin Chem Lab Med* **49**: 803-808, 2011.
- PIARULLI F, LAPOLLA A, RAGAZZI E, SUSANA A, SECHI A, NOLLINO L, COSMA C, FEDELE D, SARTORE G: Role of endogenous secretory RAGE (esRAGE) in defending against plaque formation induced by oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* **226**: 252-257, 2013.
- POPOVA EA, MIRONOVA RS, ODJAKOVA MK: Non-enzymatic glycosylation and deglycating enzymes. *Biotechnol Biotec Eq* **24**: 1928-1935, 2010.
- RABBANI N, THORNALLEY PJ: Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders. *Semin Cell Dev Biol* **22**: 309-317, 2011.
- ROBERTS AC, PORTER KE: Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diab Vasc Dis Res* **10**: 472-482, 2013.
- SANTILLI F, BUCCIARELLI L, NOTO D, CEFALU AB, DAVI V, FERRANTE E, PETTINELLA C, AVERNA MR, CIABATTONI G, DAVI G: Decreased plasma soluble RAGE in patients with hypercholesterolemia: effects of statins. *Free Radic Biol Med* **43**: 1255-1262, 2007.
- SELVIN E, HALUSHKA MK, RAWLINGS AM, HOOGEVEEN RC, BALLANTYNE CM, CORESH J, ASTOR BC: sRAGE and risk of diabetes, cardiovascular disease, and death. *Diabetes* **62**: 2116-2121, 2013.
- SILVA MS, GOMES RA, FERREIRA AEN, FREIRE AP, CORDEIRO C: The glyoxalase pathway: the first hundred years ... and beyond. *Biochem J* **453**: 1-15, 2013.
- SKRHA J JR, KALOUSOVA M, SVARCOVA J, MURAVSKA A, KVASNICKA J, LANDOVA L, ZIMA T, SKRHA 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* **120**: 277-281, 2012.
- SONG F, SCHMIDT AM: Glycation and insulin resistance: novel mechanisms and unique targets? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**: 1760-1765, 2012.
- TANHÄUSEROVÁ V, KURICOVÁ K, PÁCAL L, BARTÁKOVÁ V, ŘEHÓŘOVÁ J, SVOJANOVSKÝ J, OLŠOVSKÝ J, BĚLOBRÁDKOVÁ J, KAŇKOVÁ K: Genetic variability in enzymes of metabolic pathways conferring protection against non-enzymatic glycation versus diabetes-related morbidity and mortality. *Clin Chem Lab Med* **52**: 77-83, 2014.
- UGURLU N, GERCEKER S, YULEK F, UGURLU B, SARI C, BARAN P, CAGIL N: The levels of the circulating cellular adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and endothelin-1 and the flow-mediated vasodilatation values in patients with type 1 diabetes mellitus with early-stage diabetic retinopathy. *Intern Med* **52**: 2173-2178, 2013.
- URSO C, CAIMI G: Oxidative stress and endothelial dysfunction. *Minerva Medica* **102**: 59-77, 2011.
- VLISSARA H, STRIKER GE: Advanced glycation endproducts in diabetes and diabetic complications. *Endocrin Metab Clin* **42**: 697-719, 2013.

- WILLIAMS R, LIM JE, HARR B, WANG C, WALTERS R, DISTLER MG, TESCHKE M, WU CL, WILTSHERE T, SU AI, SOKOLOFF G, TARANTINO LM, BOREVITZ JO, PALMER AA: A common and unstable copy number variant is associated with differences in Glo1 expression and anxiety-like behavior. *Plos One* **4**: article number e4649, 2009.
- YAN SF, D'AGATI V, SCHMIDT AM, RAMASAMY R: Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): a formidable force in the pathogenesis of the cardiovascular complications of diabetes & aging. *Curr Mol Med* **7**: 699-710, 2007.
- YONEKURA H, YAMAMOTO Y, SAKURAI S, PETROVA RG, ABEDIN MJ, LI H, YASUI K, TAKEUCHI M, MAKITA Z, TAKASAWA S, OKAMOTO H, WATANABE T, YAMAMOTO H: Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J* **370**: 1097-1109, 2003.
- ZIEMAN SJ, MELENOVSKY V, CLATTENBURG L, CORRETTI MC, CAPRIOTTI A, GERSTENBLITH G, KASS DA: Advanced glycation endproduct crosslink breaker (alagebrium) improves endothelial function in patients with isolated systolic hypertension. *J Hypertens* **25**: 577-583, 2007.

## Research Article

# Skin Autofluorescence Relates to Soluble Receptor for Advanced Glycation End-Products and Albuminuria in Diabetes Mellitus

**J. Škrha Jr.,<sup>1,2</sup> J. Šoupal,<sup>2</sup> G. Loni Ekali,<sup>3</sup> M. Prázný,<sup>2</sup> M. Kalousová,<sup>1</sup> J. Kvasnička,<sup>1</sup> L. Landová,<sup>1</sup> T. Zima,<sup>1</sup> and J. Škrha<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, General University Hospital in Prague, 128 08 Prague 2, Czech Republic

<sup>2</sup> 3rd Department of Internal Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, General University Hospital in Prague, 128 08 Prague 2, Czech Republic

<sup>3</sup> Department of Internal Medicine, Ayos District Hospital, Yaounde, Cameroon

Correspondence should be addressed to J. Škrha Jr.; [jan.skrha@seznam.cz](mailto:jan.skrha@seznam.cz)

Received 21 December 2012; Revised 12 February 2013; Accepted 14 February 2013

Academic Editor: Mark A. Yorek

Copyright © 2013 J. Škrha Jr. et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The aim of this study was to compare skin autofluorescence caused by advanced glycation end-products (AGEs) with biochemical markers of endothelial dysfunction and soluble receptor for AGEs (sRAGE) in patients with diabetes. Skin autofluorescence (AF) assessed by AGE-Reader was evaluated with sRAGE and other biochemical parameters in 88 patients with diabetes (47 Type 1/T1DM/ and 41 Type 2/T2DM/) and 20 controls. Skin AF was significantly higher in T1DM and T2DM in comparison to controls ( $2.39 \pm 0.54$ ,  $2.63 \pm 0.73$  versus  $1.96 \pm 0.33$  AU;  $P < 0.0001$ ). Positive correlation of AF with sRAGE was detected in T1DM and T2DM ( $r = 0.37$ ,  $P < 0.02$  and  $r = 0.60$ ,  $P < 0.0001$ ), but not in controls. Significantly higher AF values were found in patients with positive albuminuria as compared to those with normal albuminuria. Similarly, higher AF was detected in patients with endothelial dysfunction expressed by vWF, ICAM-1, and VCAM-1. Multiple regression analysis revealed independent association of skin AF with age, sRAGE, and albumin-creatinine ratio in patients with diabetes ( $R^2 = 0.38$ ). Our study confirms that AF is elevated in patients with diabetes, especially with positive albuminuria and endothelial dysfunction. The strong and independent relationship between AF and sRAGE supports the idea that AF may reflect AGEs/RAGE interactions. The exact mechanism remains to be established.

## 1. Introduction

The accumulation of advanced glycation end-products (AGEs) belongs to the most important processes in the pathogenesis of long-term vascular complications in diabetes [1, 2]. AGEs are final products of nonenzymatic glycation of proteins, forming cross-links with collagen and other proteins, resulting in decreased vessel elasticity [3]. Cellular function and growth abilities are altered by AGEs as well [4]. In addition, AGEs activate receptors for advanced glycation end-products (RAGE) with subsequently accelerated inflammation [5, 6]. At the present time, a wide range of substances called alarmins, such as S100 calgranulins (e.g., EN-RAGE—also called S100A12), high mobility group box-1 (HMGB1), or

amyloid- $\beta$  peptide, is known to bind and activate RAGE more potently than AGEs alone [7]. Alarmins are present in physiological conditions, especially in acute inflammation, but their role is obviously also in promoting chronic inflammation as observed in diabetes, aging, atherosclerosis, tumorigenesis, or neurodegenerative disorders [8, 9]. On the contrary, the soluble form of RAGE (sRAGE) has been proposed as a protective biomarker elevated by RAGE activation [10–12].

The DCCT substudy showed that skin collagen glycation products are better predictors for diabetes complications than HbA<sub>1c</sub> [13]. The need for skin biopsy was, however, a serious limitation in clinical monitoring. Other clinical studies have demonstrated that increased serum levels of AGEs are seen within 2–5 years of diabetes onset according to glycemic

levels [14]. Assessment of serum AGEs was, however, rarely used in clinical practice, since expensive technics such as gas and liquid chromatography or mass spectrometry were necessary [15]. Another determination of fluorescent AGEs was based on spectrofluorometric detection [16], but this method was rather abandoned for nonspecificity.

Recently, the AGE-Reader measuring skin autofluorescence was developed for noninvasive assessment of AGEs levels in the skin. A significant correlation between skin AGEs measured noninvasively and skin biopsy levels of collagen-linked fluorescence was found. Moreover, skin AF also correlated with serum levels of AGEs (pentosidine, CML, CEL) [17]. The results may reflect both metabolic and cardiovascular risks in patients with diabetes and thus could be routinely used in diabetes care [18, 19].

The aim of this study was to compare AGEs levels in the skin measured by AGE-Reader with biochemical markers of endothelial dysfunction (vWF, ICAM, VCAM, E-selectin, and P-selectin) and sRAGE levels in Type 1 and Type 2 patients with diabetes, to search for a relationship between AGE/RAGE axis and endothelial function.

## 2. Patients and Methods

**2.1. Subjects.** The whole group of 88 patients with diabetes consisted of 47 patients (27 males, 20 females) with Type 1 diabetes mellitus (T1DM) and 41 patients (25 males, 16 females) with Type 2 diabetes mellitus (T2DM), all from the diabetes outpatient clinic. Since the skin autofluorescence is age dependent [17], the subjects of roughly similar variation in calendar age were included. Their characteristics are shown in Table 1. All patients with severe hypertension, renal failure or liver impairment, neurodegenerative disorders, known malignancy, or infections, which could significantly influence laboratory variables, were excluded from the study. All patients with Type 1 diabetes were on intensified insulin treatment using 4 to 5 insulin injections, 20 patients with Type 2 diabetes were on metformin alone, 10 patients were on oral agents plus insulin, and the remaining 11 patients with Type 2 diabetes were treated by insulin only. Twenty T1DM and 30 T2DM were treated by statins. ACE inhibitors or AT1 blockers were used in 25 T1DM and 38 T2DM. Control group consisted of 20 healthy persons (5 males, 15 females) of comparable age.

The study was performed in accordance with principles of the Declaration of Helsinki and was approved by local Ethics Committee of the General University Hospital and First Faculty of Medicine. All examined persons gave informed consent prior to being enrolled into the study.

**2.2. Skin Autofluorescence.** Skin AF was assessed on the ventral site of the forearm by AGE-Reader (DiagnOptics BV, Groningen, The Netherlands), as described previously [20]. Skin AF is calculated by dividing the mean value of the emitted light intensity per nm between 420 and 600 nm by the mean value of the excitation light intensity per nm between

300 and 420 nm, expressed in arbitrary units (AU). The intra-individual percent Altman error is 5.0% on a single day and 5.9% for seasonal changes [17].

**2.3. Biochemical Methods.** Fasting blood samples were collected between 7.00 and 8.00 AM from the cubital vein. Routine biochemical parameters were determined in fresh samples, whereas special biochemical analyses were done in serum frozen at -80°C until the assay measurement.

Serum concentrations of soluble RAGE were measured according to the manufacturer's protocol using sandwich ELISA (Quantikine, RD Systems, Minneapolis, MN, USA). In this assay, the plate is coated with a monoclonal antibody against RAGE while a polyclonal antibody is used for detection. This assay measures both C-truncated RAGE that has been cleaved from the cell surface, and esRAGE as well [21]. Endothelial dysfunction was evaluated by serum concentrations of specific markers, such as adhesion molecules (ICAM, VCAM, E-selectin, and P-selectin) and vWF, as proposed previously [22, 23]. Cell adhesion molecules Human sP-selectin/CD62P, Human sE-selectin/CD62E, Human sICAM-1/CD54, and Human sVCAM-1 were estimated by ELISA kits manufactured by RD System Europe (Abingdon, UK). von Willebrand factor (vWF) was determined by Corgenix (Broomfield, USA).

Routine biochemical parameters including urea, creatinine, transaminases, alkaline phosphatase,  $\gamma$ -glutamyltransferase, total cholesterol, and triglycerides were determined by standard methods in central laboratory on Modular Roche analyzer. Fasting plasma glucose was determined by glucose oxidase method on glucose analyzer Super GLAmbulance (Dr. Müller Gerätebau, Freital, Germany); glycated hemoglobin HbA<sub>1c</sub> was measured by HPLC on Variant II (Biorad, France) and expressed according to IFCC (normal values are 28–40 mmol/mol).

Albuminuria was determined after exclusion of urinary infection in the second morning sample by radioimmunoassay using commercial kits (Immunotech, Czech Republic) and albumin/creatinine ratio (ACR) was calculated. Positive albuminuria (A+) was recognized when albumin/creatinine ratio >3 g/mol creatinine was found. Logarithmically transformed data were used for further analysis because log-normal distribution of the values was found. Renal functions were evaluated by estimated glomerular filtration rate (eGFR) calculated by MDRD formula [24].

**2.4. Statistical Analysis.** Results of biochemical parameters are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) or as median (interquartile range). Differences between the groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc test analysis. Correlations between variables were assessed by Pearson's or Spearman's coefficient as appropriate. Variables correlated with AF at  $P < 0.05$  were included in the multivariate analysis. Multiple linear regression analysis was carried out to disclose the statistically independent associations of AF with other variables. For statistical analyses, the software "Statistica 10" by StatSoft

Inc. was used. The results were considered as statistically significant at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

The characteristics of patients with Type 1 and Type 2 diabetes and control persons are shown in Table 1. The influence of gender as an independent variable on measured variables was not detected. Diabetes control was not significantly different between Type 1 and Type 2 diabetic patients ( $\text{HbA}_{1c} 74 \pm 14$  versus  $71 \pm 21 \text{ mmol/mol}$ , NS). Significantly higher fructosamine was observed in both T1DM and T2DM as compared to controls ( $369 \pm 65$  and  $305 \pm 47$  versus  $237 \pm 20 \mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.0001$ ).

The results of skin AF and special biochemical variables in T1DM and T2DM as well as in control group are shown in Table 2. Skin AF was significantly higher in patients with T1DM and T2DM in comparison to controls ( $2.39 \pm 0.54$ ,  $2.63 \pm 0.73$  versus  $1.96 \pm 0.33 \text{ AU}$ ;  $P < 0.0001$ ), but the difference between T1DM and T2DM was not significant (Table 2). No significant differences in sRAGE concentration and in other special biochemical variables were found between both types of diabetes.

Type 1 and Type 2 diabetic patients either with or without microalbuminuria were evaluated together (Table 3). Skin AF was higher in diabetic patients with microalbuminuria (A+) compared to those with normoalbuminuria (A-). Similarly, elevated sRAGE concentrations were found in microalbuminuric as compared to normoalbuminuric patients.

Regarding endothelial dysfunction (ED), vWF, ICAM-1, and VCAM-1 were selected as indicators. All patients with diabetes were divided according to the activity of vWF into  $\text{ED}_{\text{vWF}}^-$  ( $\text{vWF} < 110\%$ ) and  $\text{ED}_{\text{vWF}}^+$  ( $\text{vWF} > 110\%$ ) subgroups, according to the concentration of ICAM-1 into  $\text{ED}_{\text{ICAM-1}}^-$  ( $\text{ICAM-1} < 300 \mu\text{g/L}$ ) and  $\text{ED}_{\text{ICAM-1}}^+$  ( $\text{ICAM-1} > 300 \mu\text{g/L}$ ), and according to the concentration of VCAM-1 into  $\text{ED}_{\text{VCAM-1}}^-$  ( $\text{VCAM-1} < 800 \mu\text{g/L}$ ) and  $\text{ED}_{\text{VCAM-1}}^+$  ( $\text{VCAM-1} > 800 \mu\text{g/L}$ ), respectively. Significant differences were observed in the skin AF both between  $\text{ED}_{\text{vWF}}^-$  and  $\text{ED}_{\text{vWF}}^+$  subgroups ( $2.27 \pm 0.52$  versus  $2.63 \pm 0.55 \text{ AU}$ ,  $P < 0.02$ ), between  $\text{ED}_{\text{ICAM-1}}^-$  and  $\text{ED}_{\text{ICAM-1}}^+$  subgroups ( $2.31 \pm 0.50$  versus  $2.91 \pm 0.48 \text{ AU}$ ,  $P < 0.001$ ), and between  $\text{ED}_{\text{VCAM-1}}^-$  and  $\text{ED}_{\text{VCAM-1}}^+$  subgroups ( $2.30 \pm 0.42$  versus  $2.61 \pm 0.63 \text{ AU}$ ,  $P < 0.05$ ). On the contrary, differences in  $\text{HbA}_{1c}$  in  $\text{ED}_{\text{vWF}}^-$  versus  $\text{ED}_{\text{vWF}}^+$  ( $73 \pm 17$  versus  $80 \pm 19 \text{ mmol/mol}$ , NS),  $\text{ED}_{\text{ICAM-1}}^-$  versus  $\text{ED}_{\text{ICAM-1}}^+$  ( $74 \pm 17$  versus  $83 \pm 20 \text{ mmol/mol}$ , NS), and  $\text{ED}_{\text{VCAM-1}}^-$  versus  $\text{ED}_{\text{VCAM-1}}^+$  ( $74 \pm 18$  versus  $79 \pm 17 \text{ mmol/mol}$ , NS) were not significant.

Differences in the skin AF observed in patients using antihypertensive medication (ACE inhibitors or AT1 blockers) or statins did not reach statistical significance. Similarly, the effect of antihyperglycemic therapy on AF levels was evaluated, but there were no significant differences in the skin AF between patients on metformin alone, metformin + insulin, or insulin alone.

Univariate correlation analysis showed several relationships between skin AF and biochemical variables, and significant correlations are shown in Table 4. Firstly, skin AF

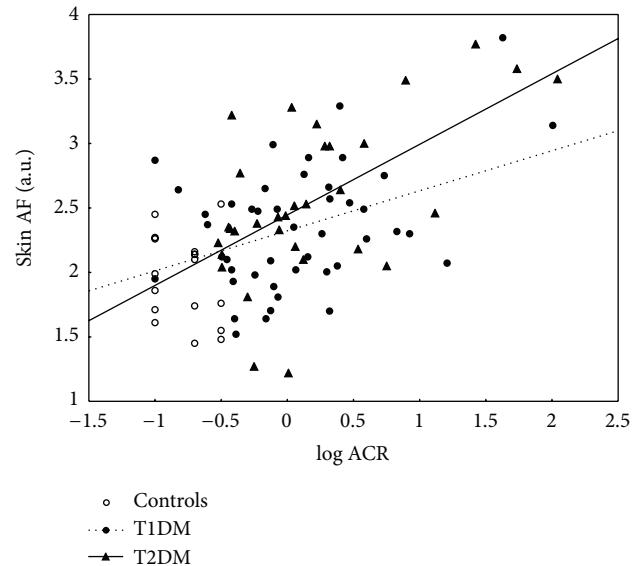


FIGURE 1: Relationship of skin AF and albuminuria expressed by ACR in controls, T1DM, and T2DM.

was related to diabetes control expressed by  $\text{HbA}_{1c}$  in T2DM ( $r = 0.41$ ,  $P < 0.01$ ), but not in T1DM ( $r = 0.22$ , NS). Neither relationship of AF to fructosamine nor to fasting plasma glucose concentrations were observed in any group. Skin AF was age dependent both in controls ( $r = 0.73$ ,  $P < 0.0005$ ) and in T1DM ( $r = 0.54$ ,  $P < 0.0001$ ), but not significantly in T2DM ( $r = 0.22$ , NS). In T1DM and T2DM patients skin AF correlated with albuminuria expressed as albumin/creatinine ratio ( $r = 0.34$ ,  $P < 0.05$ ;  $r = 0.44$ ,  $P < 0.01$ ) (Figure 1) or inversely with eGFR ( $r = -0.48$ ,  $P < 0.001$ ;  $r = -0.30$ ,  $P = 0.05$ ).

In T1DM but not T2DM, positive relationship was found between skin AF and ICAM-1 ( $r = 0.61$ ,  $P < 0.001$ ) and vWF ( $r = 0.52$ ,  $P < 0.005$ ). Interestingly, a significant positive correlation of skin AF with sRAGE was detected in T1DM and even stronger in T2DM ( $r = 0.37$ ,  $P < 0.02$  and  $r = 0.60$ ,  $P < 0.0001$ ), but not in controls ( $r = 0.29$ , NS) (Figure 2). If the patients with diabetes were divided into subgroups without (A-) and with (A+) microalbuminuria according to ACR, an important positive correlation of skin AF with sRAGE was observed in A+ subgroup ( $r = 0.61$ ,  $P < 0.006$ ), while it was less expressed in A- subgroup ( $r = 0.27$ ,  $P < 0.03$ ). In both patients with diabetes and controls, no relationship of autofluorescence with sex, blood pressure, or BMI was observed.

Multiple linear regression analysis was performed to establish independent associations of skin AF with those variables in which skin AF was correlated in univariate analysis at  $P < 0.05$ . Skin AF was independently associated with age ( $\beta = 0.33$ ;  $P < 0.002$ ), sRAGE ( $\beta = 0.36$ ;  $P < 0.0002$ ), and albuminuria ( $\beta = 0.23$ ;  $P < 0.02$ ) when the patients with both types of diabetes were analyzed together ( $R^2 = 0.38$ ). In T1DM and T2DM evaluated separately skin AF was associated independently with age ( $\beta = 0.38$ ;  $P < 0.01$ ) in T1DM ( $R^2 = 0.40$ ) and with sRAGE ( $\beta = 0.53$ ;

TABLE 1: Characteristics of patients with Type 1 (T1DM), Type 2 (T2DM), and controls.

	T1DM (n = 47)	T2DM (n = 41)	Controls (n = 20)	ANOVA P value
Age (yrs)	46 (25–76)	58 (39–77)	46 (24–65)	
Sex (% of males)	57	61	25	
Duration of DM (yrs)	14 (3–52)	9 (2–31)	—	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.9 ± 2.9 <sup>z</sup>	33.1 ± 10.0 <sup>c</sup>	25.5 ± 3.4	<0.0001
SBP (mm Hg)	131 ± 10 <sup>x</sup>	138 ± 13 <sup>a</sup>	129 ± 12	<0.01
DBP (mm Hg)	78 ± 7	79 ± 8	75 ± 6	0.24
Cholesterol (mmol/L)	4.69 ± 0.79	4.54 ± 0.92	4.48 ± 0.61	0.53
Triglycerides (mmol/L)	1.04 ± 0.53 <sup>z</sup>	1.92 ± 0.92 <sup>c</sup>	1.09 ± 0.58	<0.0001
Glucose (mmol/L)	7.9 ± 4.0 <sup>c</sup>	9.3 ± 3.5 <sup>c</sup>	4.5 ± 0.6	<0.0001
HbA <sub>1c</sub> (mmol/mol, IFCC)	74 ± 14 <sup>c</sup>	71 ± 21 <sup>c</sup>	39 ± 5	<0.0001
Fructosamine (μmol/L)	369 ± 65 <sup>cz</sup>	305 ± 47 <sup>c</sup>	237 ± 20	<0.0001
CRP (mg/L)	3.0 ± 1.9 <sup>a</sup>	4.1 ± 2.1 <sup>a</sup>	1.4 ± 1.8	<0.005
Albumin/creatinine (g/mol)	1.17 <sup>a</sup> (0.29–4.79)	1.86 <sup>c</sup> (0.36–9.55)	0.45 (0.19–1.14)	<0.01
Creatinine (μmol/L)	85.8 ± 33.4	88.9 ± 22.2 <sup>a</sup>	72.3 ± 12.8	0.10
eGFR (ml·s <sup>-1</sup> ·(1.73 m <sup>2</sup> ) <sup>-1</sup> )	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.3	1.4 ± 0.3	0.05

Results are means ± SD, or means with 1 SD range, in age and duration of DM medians with ranges. One-way ANOVA was performed, with P values in the last column of the table. Statistical significance expressed by LSD post hoc test between DM and control persons: <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01, and <sup>c</sup>P < 0.001, and between T1DM and T2DM: <sup>x</sup>P < 0.05, <sup>y</sup>P < 0.01, and <sup>z</sup>P < 0.001.

Abbreviations: DM: diabetes mellitus; BMI: body mass index; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; CRP: C-reactive peptide; eGFR: estimated glomerular filtration rate.

TABLE 2: Skin autofluorescence and novel biochemical parameters.

	T1DM (n = 47)	T2DM (n = 41)	Controls (n = 20)	ANOVA P value
AF (AU)	2.39 ± 0.54 <sup>b</sup>	2.63 ± 0.73 <sup>c</sup>	1.96 ± 0.33	<0.0001
sRAGE (ng/L)	1250 ± 627	1040 ± 567	1163 ± 537	0.26
vWF (%)	114 ± 48	127 ± 56 <sup>a</sup>	93 ± 25	0.038
sICAM-1 (μg/L)	269 ± 89	266 ± 79	223 ± 82	0.10
sVCAM-1 (μg/L)	907 ± 498 <sup>c</sup>	816 ± 271 <sup>c</sup>	392 ± 91	<0.0001
P-selectin (μg/L)	113 ± 36 <sup>b</sup>	101 ± 35 <sup>c</sup>	145 ± 52	0.0004
E-selectin (μg/L)	29 ± 16 <sup>a</sup>	36 ± 16	41 ± 15	0.011

Results are means ± SD, or means with 1 SD range. One-way ANOVA was performed, with P values in the last column of the table. Statistical significance expressed by LSD post hoc test between DM and control persons: <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01, and <sup>c</sup>P < 0.001.

Abbreviations: AF: autofluorescence; AU: arbitrary unit; sRAGE: soluble receptor for advanced glycation end-products; vWF: von Willebrand factor; sICAM: intercellular adhesion molecule; sVCAM: vascular cell adhesion molecule.

P < 0.004) in T2DM ( $R^2 = 0.44$ ). In controls, skin AF was independently associated only with age ( $\beta = 0.55$ ;  $P < 0.03$ ;  $R^2 = 0.62$ ). Other parameters such as gender, blood pressure, BMI, total cholesterol, HbA<sub>1c</sub>, or fructosamine were not associated with skin AF in our multiple linear regression analysis.

#### 4. Discussion

This is the first study describing significant correlation of skin autofluorescence with sRAGE levels in both T1DM and T2DM. This relationship significantly depends on the severity of diabetic nephropathy. Previously, elevated levels of skin AGEs and sRAGE were observed in patient with systemic lupus erythematosus [25], and a significant correlation was described between skin AF and sRAGE in one Japanese

with stable coronary artery disease [26]. However, the strong relationship of skin AF and sRAGE in patients with diabetes has not been reported yet. The AGEs/RAGE interaction results in the generation of intracellular oxidative stress, an enhanced inflammatory response and upregulated RAGE-ligand interaction [7]. On the contrary, sRAGE has been reported to act as a decoy for RAGE ligands. But this protective role has been recently supposed to be very limited, since the concentration of sRAGE is many times lower than the concentration of RAGE ligands [27]. In our study, the total pool of soluble RAGE with Quantikine immunoassay was measured and therefore we cannot discern whether the different variants of sRAGE (esRAGE or C-truncated RAGE) have some specific association to the skin autofluorescence. However, strong correlation of sRAGE and esRAGE was reported previously ( $r = 0.95$ ,  $P < 0.001$ ) [28].

TABLE 3: Skin autofluorescence and novel biochemical parameters in subgroups without (A-) and with (A+) (micro)albuminuria according to ACR.

	A+ (n = 19)	A- (n = 69)	Controls (n = 20)	ANOVA P value
AF (AU)	2.84 ± 0.80 <sup>cx</sup>	2.41 ± 0.56 <sup>b</sup>	1.96 ± 0.33	<0.0001
Albumin/creatinine (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
sICAM ( $\mu$ g/L)	324 ± 102 <sup>cy</sup>	251 ± 70	223 ± 82	0.0003
sVCAM ( $\mu$ g/L)	965 ± 408 <sup>c</sup>	832 ± 400 <sup>c</sup>	392 ± 91	<0.0001
P-selectin ( $\mu$ g/L)	102 ± 33 <sup>b</sup>	109 ± 37 <sup>b</sup>	145 ± 52	0.0008
E-selectin ( $\mu$ g/L)	39 ± 18	31 ± 15 <sup>a</sup>	41 ± 15	0.016

Results are means ± SD, or means with 1 SD range. One-way ANOVA was performed, with P values in the last column of the table. Statistical significance expressed by LSD post hoc test between DM and control persons: <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01, and <sup>c</sup>P < 0.001 and between A+ and A-; <sup>x</sup>P < 0.05, <sup>y</sup>P < 0.01, <sup>z</sup>P < 0.001.

Abbreviations: AF: autofluorescence; AU: arbitrary unit; HbA<sub>1c</sub>: glycated hemoglobin; sRAGE: soluble receptor for advanced glycation end-products; vWF: von Willebrand factor; sICAM: intercellular adhesion molecule; sVCAM: vascular cell adhesion molecule.

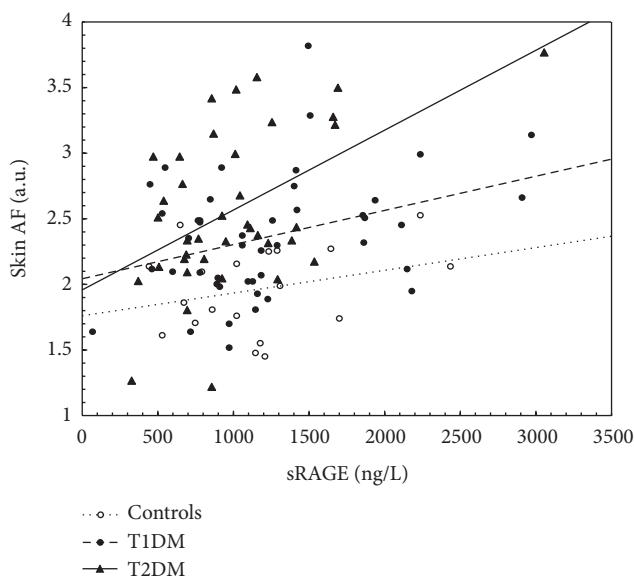


FIGURE 2: Relationship of skin AF and sRAGE in controls, T1DM and T2DM.

Our results confirmed higher skin autofluorescence in T1DM and T2DM than in controls. Similar results were reported previously demonstrating significant relationship between skin autofluorescence and fluorescent and nonfluorescent skin AGEs content [17]. The increased skin accumulation of AGEs in patients with diabetes in consequence of chronic hyperglycemia and/or oxidative stress has been proposed. In our study we did not perform skin biopsies to verify the relationship between skin autofluorescence and tissue AGEs content. Moreover, it should be pointed out that AGEs accumulation in tissues and skin AF, respectively, need not to reflect AGEs levels in circulation, as observed by Nienhuis et al. [25]. Patients in our study with developed microalbuminuria as an early clinical sign of nephropathy

TABLE 4: The univariate significant correlations between skin autofluorescence and biochemical parameters.

	Skin AF		
	T1DM	T2DM	Controls
Duration of DM	0.25 (NS)	<b>0.38</b> (0.01)	—
Age	<b>0.53</b> (0.0001)	0.22 (NS)	<b>0.73</b> (0.0004)
HbA <sub>1c</sub>	0.22 (NS)	<b>0.41</b> (0.007)	0.33 (NS)
sRAGE	<b>0.37</b> (0.02)	<b>0.60</b> (0.00003)	0.29 (NS)
sICAM	<b>0.61</b> (0.0007)	0.16 (NS)	0.37 (NS)
vWF	<b>0.52</b> (0.005)	0.28 (NS)	<b>0.63</b> (0.004)
Creatinine	<b>0.34</b> (0.02)	0.25 (NS)	-0.28 (NS)
ACR	<b>0.34</b> (0.02)	<b>0.44</b> (0.007)	0.22 (NS)
eGFR	<b>-0.48</b> (0.001)	<b>-0.30</b> (0.05)	-0.33 (NS)

r in the first line of the cell, P in the brackets.

Abbreviations: AF: autofluorescence; AU: arbitrary unit; HbA<sub>1c</sub>: glycated hemoglobin; sRAGE: soluble receptor for advanced glycation end-products; vWF: von Willebrand factor; sICAM: intercellular adhesion molecule; ACR: albumin-creatinine ratio; eGFR: estimated glomerular filtration rate.

had significantly higher skin autofluorescence as compared to those without renal changes also after adjustment to renal functions. The same was shown in the follow-up study by Gerrits et al. [29].

In the present study we found a positive association between skin AF levels and HbA<sub>1c</sub> in T2DM, but not in T1DM. Such association was not found in T2DM in a cohort

by Gerrits et al. [30]. Since the relatively short turnover time of hemoglobin [31] as compared to skin AGEs formation and degradation, the HbA<sub>1c</sub> values cannot always reflect AGEs accumulation. In addition, neither shortly glycated proteins expressed by fructosamine nor fasting plasma glucose were related to AF in our study.

Endothelial dysfunction indicated by elevation of vWF, ICAM-1, or VCAM-1 was associated with significantly higher AF than in diabetic patients with normal levels of these parameters. This is the first observation to our knowledge when AF is higher in diabetic patients with endothelial dysfunction. Elevated vWF and VCAM-1 concentrations as markers of endothelial activation were found together with higher skin autofluorescence in patients with rheumatoid arthritis [32].

There are some limitations of this study. Firstly, we have not measured serum levels of AGEs, since they were detected by AGE-Reader. Some nonfluorescent AGEs are not detected by AGE-Reader, but it has been reported previously that skin autofluorescence strongly correlated with skin levels of nonfluorescent AGE [17]. Moreover, the total specificity and sensitivity of this tool were already reported [17]. Secondly, all subjects in this study were Caucasians and therefore the results cannot be applied in general, since ethnic determinants may influence AF and other parameters. In addition, the total number of patients in each group was limited. Finally, multiple factors such as age, ethnic determinants, AGER gene polymorphisms, or renal functions may influence the sRAGE levels [11, 33, 34]. Similarly, since skin AF is age dependent [17, 35], we involved younger T2DM predominantly to maintain age-matched groups for further analysis. Despite the fact that sRAGE levels are modified in the presence of microalbuminuria or slightly decreased renal functions, patients with such complications were not excluded from this study although severe renal impairment was not present in any of our patients.

In conclusion, skin AF is an applicable variable for AGEs accumulation assessment. Our study confirms that skin autofluorescence is elevated in patients with diabetes and the most significant increase has been found in patients with microangiopathy expressed mainly by albuminuria. Similar results were found in sRAGE concentrations. The strong relationship between AF and sRAGE supports the idea of mutual interactions between RAGE, AGEs, and other RAGE ligands. Endothelial dysfunction could be an important factor accelerating the AGEs accumulation as well. The exact mechanism of such interactions in patients with diabetes remains to be elucidated.

## Abbreviations

- AGEs: Advanced glycation end-products
- AF: Autofluorescence
- RAGE: Receptor for advanced glycation end-products
- HbA<sub>1c</sub>: Glycated hemoglobin
- vWF: Von Willebrand factor
- ICAM: Intercellular adhesion molecule
- VCAM: Vascular cell adhesion molecule
- ACR: Albumin-creatinine ratio

eGFR: Estimated glomerular filtration rate

BMI: Body mass index

SBP: Systolic blood pressure

DBP: Diastolic blood pressure

CML: Carboxymethyllysine

CEL: Carboxyethyllysine.

## Conflict of Interests

The authors declare that they have no competing interests as defined by Hindawi Disclosure Policy or other interests that might be perceived to influence the results and/or discussion reported in this paper.

## Acknowledgments

The authors thank Mrs. Marcela Jarolímková and Mrs. Dita Hudcová for the technical assistance. The study was supported by GrantS GAUK 623312, SVV-2012-264512, and PRVOUK-P25/LF1/2.

## References

- [1] S. Genuth, W. Sun, P. Cleary et al., "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*, vol. 54, no. 11, pp. 3103–3111, 2005.
- [2] M. Brownlee, "The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism," *Diabetes*, vol. 54, no. 6, pp. 1615–1625, 2005.
- [3] S. J. Zieman, V. Melenovsky, L. Clattenburg et al., "Advanced glycation endproduct crosslink breaker (alagebrium) improves endothelial function in patients with isolated systolic hypertension," *Journal of Hypertension*, vol. 25, no. 3, pp. 577–583, 2007.
- [4] I. Giardino, D. Edelstein, and M. Brownlee, "Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 94, no. 1, pp. 110–117, 1994.
- [5] M. A. Hofmann, S. Drury, C. Fu et al., "RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides," *Cell*, vol. 97, no. 7, pp. 889–901, 1999.
- [6] K. M. Haslbeck, E. Schleicher, A. Bierhaus et al., "The AGE/RAGE/NF-κB pathway may contribute to the pathogenesis of polyneuropathy in impaired glucose tolerance (IGT)," *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, vol. 113, no. 5, pp. 288–291, 2005.
- [7] D. Yao and M. Brownlee, "Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands," *Diabetes*, vol. 59, no. 1, pp. 249–255, 2010.
- [8] A. Bierhaus and P. P. Nawroth, "Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications," *Diabetologia*, vol. 52, no. 11, pp. 2251–2263, 2009.

- [9] S. F. Yan, S. D. Yan, R. Ramasamy, and A. M. Schmidt, "Tempering the wrath of RAGE: an emerging therapeutic strategy against diabetic complications, neurodegeneration, and inflammation," *Annals of Medicine*, vol. 41, no. 6, pp. 408–422, 2009.
- [10] N. Katakami, M. Matsuhisa, H. Kaneto et al., "Endogenous secretory RAGE but not soluble RAGE is associated with carotid atherosclerosis in type 1 diabetes patients," *Diabetes and Vascular Disease Research*, vol. 5, no. 3, pp. 190–197, 2008.
- [11] S. F. Yan, R. Ramasamy, and A. M. Schmidt, "Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging," *Biochemical Pharmacology*, vol. 79, no. 10, pp. 1379–1386, 2010.
- [12] N. Vazzana, F. Santilli, C. Cuccurullo, and G. Davì, "Soluble forms of RAGE in internal medicine," *Internal and Emergency Medicine*, vol. 4, no. 5, pp. 389–401, 2009.
- [13] V. M. Monnier, O. Bautista, D. Kenny et al., "Skin collagen glycation, glycoxidation, and crosslinking are lower in subjects with long-term intensive versus conventional therapy of type 1 diabetes: relevance of glycated collagen products versus HbA1c as markers of diabetic complications," *Diabetes*, vol. 48, no. 4, pp. 870–880, 1999.
- [14] F. Chiarelli, M. De Martino, A. Mezzetti et al., "Advanced glycation end products in children and adolescents with diabetes: relation to glycemic control and early microvascular complications," *Journal of Pediatrics*, vol. 134, no. 4, pp. 486–491, 1999.
- [15] R. Meerwaldt, H. L. Lutgers, T. P. Links et al., "Skin autofluorescence is a strong predictor of cardiac mortality in diabetes," *Diabetes Care*, vol. 30, no. 1, pp. 107–112, 2007.
- [16] G. Münch, R. Keis, A. Weßels et al., "Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA1," *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, vol. 35, no. 9, pp. 669–677, 1997.
- [17] R. Meerwaldt, R. Graaf, P. H. N. Oomen et al., "Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation," *Diabetologia*, vol. 47, no. 7, pp. 1324–1330, 2004.
- [18] N. Sattar, "Biomarkers for diabetes prediction, pathogenesis or pharmacotherapy guidance? Past, present and future possibilities," *Diabetic Medicine*, vol. 29, pp. 5–13, 2012.
- [19] M. Monami, C. Lamanna, F. Gori, F. Bartalucci, N. Marchionni, and E. Mannucci, "Skin autofluorescence in type 2 diabetes: beyond blood glucose," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 79, no. 1, pp. 56–60, 2008.
- [20] D. J. Mulder, T. Van De Water, H. L. Lutgers et al., "Skin autofluorescence, a novel marker for glycemic and oxidative stress-derived advanced glycation end-products: an overview of current clinical studies, evidence, and limitations," *Diabetes Technology and Therapeutics*, vol. 8, no. 5, pp. 523–535, 2006.
- [21] H. Yonekura, Y. Yamamoto, S. Sakurai et al., "Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury," *Biochemical Journal*, vol. 370, no. 3, pp. 1097–1109, 2003.
- [22] M. Haim, D. Tanne, V. Boyko et al., "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 (BIP) Study," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 39, no. 7, pp. 1133–1138, 2002.
- [23] M. E. Widlansky, N. Gokce, J. F. Keaney, and J. A. Vita, "The clinical implications of endothelial dysfunction," *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 42, no. 7, pp. 1149–1160, 2003.
- [24] A. S. Levey, J. P. Bosch, J. B. Lewis, T. Greene, N. Rogers, and D. Roth, "A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation," *Annals of Internal Medicine*, vol. 130, no. 6, pp. 461–470, 1999.
- [25] H. L. Nienhuis, K. De Leeuw, J. Bijzet et al., "Skin autofluorescence is increased in systemic lupus erythematosus but is not reflected by elevated plasma levels of advanced glycation end-products," *Rheumatology*, vol. 47, no. 10, pp. 1554–1558, 2008.
- [26] D. J. Mulder, P. L. van Haelst, S. Gross et al., "Skin autofluorescence is elevated in patients with stable coronary artery disease and is associated with serum levels of neopterin and the soluble receptor for advanced glycation end products," *Atherosclerosis*, vol. 197, no. 1, pp. 217–223, 2008.
- [27] P. M. Humpert, Z. Djuric, S. Kopf et al., "Soluble RAGE but not endogenous secretory RAGE is associated with albuminuria in patients with type 2 diabetes," *Cardiovascular Diabetology*, vol. 6, article 9, 2007.
- [28] M. Kalousová, M. Jáchymová, M. Oto et al., "Receptor for advanced glycation end products—soluble form and gene polymorphisms in chronic haemodialysis patients," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 22, no. 7, pp. 2020–2026, 2007.
- [29] E. G. Gerrits, H. L. Lutgers, N. Kleefstra et al., "Skin autofluorescence: a tool to identify type 2 diabetic patients at risk for developing microvascular complications," *Diabetes Care*, vol. 31, no. 3, pp. 517–521, 2008.
- [30] E. G. Gerrits, H. L. Lutgers, N. Kleefstra, K. H. Groenier, A. J. Smit, and R. O. Gans, "Skin advanced glycation end product accumulation is poorly reflected by glycemic control in type 2 diabetic patients (ZODIAC-9)," *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 2, pp. 572–577, 2008.
- [31] A. J. Furth, "Glycated proteins in diabetes," *British Journal of Biomedical Science*, vol. 54, no. 3, pp. 192–200, 1997.
- [32] L. de Groot, H. Hinkema, J. Westra, A. J. Smit, C. G. M. Kallenberg, and M. Bijl, "Advanced glycation end-products are increased in rheumatoid arthritis patients with controlled disease," *Arthritis Research & Therapy*, vol. 13, article R205, 2011.
- [33] M. Kalousova, M. Hodkova, M. Kazdorova, J. Fialova, V. Tesar, and S. Dusilova-Sulkova, "Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function," *American Journal of Kidney Diseases*, vol. 47, pp. 406–411, 2006.
- [34] K. Kankova, M. Kalousova, M. Hertlova, D. Krusova, J. Olsovsky, and T. Zima, "Soluble RAGE, diabetic nephropathy and genetic variability in the AGER gene," *Archives of Physiology and Biochemistry*, vol. 114, pp. 111–119, 2008.
- [35] H. L. Lutgers, E. G. Gerrits, R. Graaff et al., "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*, vol. 52, no. 5, pp. 789–797, 2009.

Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta  
Kateřinská 32, Praha 2

**Prohlášení zájemce o nahlédnutí  
do závěrečné práce absolventa studijního programu  
uskutečňovaného na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze**

Jsem si vědom/a, že závěrečná práce je autorským dílem a že informace získané nahlédnutím do zpřístupněné závěrečné práce nemohou být použity k výdělečným účelům, ani nemohou být vydávány za studijní, vědeckou nebo jinou tvůrčí činnost jiné osoby než autora.

Byl/a jsem seznámen/a se skutečností, že si mohu pořizovat výpisy, opisy nebo kopie závěrečné práce, jsem však povinen/a s nimi nakládat jako s autorským dílem a zachovávat pravidla uvedená v předchozím odstavci.