

**ANNALES
ACADEMIAE MEDICAE
GEDANENSIS
TOM XXXVIII
2008
SUPPLEMENT 2**

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU

Małgorzata Myśliwiec

**WARTOŚĆ PROGNOSTYCZNA MARKERÓW
IMMUNOLOGICZNYCH I BIOCHEMICZNYCH
WE WCZESNYM ETAPIE ROZWOJU NEFROPATII
I RETINOPATII CUKRZYCOWEJ U DZIECI**

***PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF IMMUNOLOGIC
AND BIOCHEMICAL MARKERS AT THE EARLY STAGE
OF DIABETIC NEPHROPATHY AND RETINOPATHY
DEVELOPMENT IN CHILDREN***

Rozprawa habilitacyjna

Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii
Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik Kliniki:
Prof. dr hab. med. Anna Balcerska

Gdańsk 2008

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

REDAKTOR NACZELNY
PRESIDENT OF THE EDITORIAL BOARD
prof. dr Marek Grzybiak

KOMITET REDAKCYJNY
EDITORIAL BOARD
Z-ca redaktora naczelnego – prof. dr Marek Latoszek
sekretarz redakcji – dr Włodzimierz Kuta,
prof. dr Andrzej Hellmann, prof. dr Józef Jordan, prof. AMG,
mgr Józefa de Laval, prof. dr Jerzy Łukasiak,
prof. dr Zbigniew Machaliński, prof. dr Stefan Raszeja

ADRES REDAKCJI
ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE
Annales Academiae Medicae Gedanensis
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,
80-210 Gdańsk, Poland
e-mail: annales@amg.gda.pl

Artykuły opublikowane w Annales AMG
są zamieszczane w bazie EMBASE
Articles published In Annales AMG are covered
by the Excerpta Medica database (EMBASE)

PL ISSN 0303–4135

Akademia Medyczna w Gdańsku

Wyrażam ogromną wdzięczność ***Pani Profesor dr hab. med. Annie Balcerskiej***, kierownikowi Katedry i Kliniki Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii Akademii Medycznej w Gdańsku za przekazanie mi wszechstronnej wiedzy pediatrycznej, za stworzenie warunków do pracy klinicznej i naukowej, za pomoc merytoryczną, wyrozumiałość oraz życzliwość okazywaną podczas pisania niniejszej pracy.

Pani Profesor dr hab. med. Jolancie Myśliwskiej, kierownikowi Zakładu Immunologii, Katedry Histologii i Immunologii Akademii Medycznej w Gdańsku, za zaszczerpienie we mnie entuzjazmu dla zagadnień z dziedziny immunologii klinicznej, za życzliwe wsparcie naukowe i umożliwienie przeprowadzenia badań immunologicznych na terenie Zakładu Immunologii.

Pani Profesor Krystynie Raczyńskiej, kierownikowi Katedry i Kliniki Chorób Oczu za owocną współpracę, życzliwość i umożliwienie wykonania badań okulistycznych.

Dr n. med. Katarzynie Zorenio, mojej przyjaciółce, pracującej w Zakładzie Immunologii Akademii Medycznej w Gdańsku, za wykonanie badań immunologicznych oraz za wspaniałą współpracę naukową.

Moim koleżankom i kolegom z Oddziału Diabetologii Dziecięcej za atmosferę pełną życzliwości, która ułatwiła mi realizację pracy

oraz

Wszystkim Osobom Niewymienionym tu z Imienia, których wiedza i życzliwa pomoc przyczyniła się do powstania pracy.

Mojemu mężowi dziękuję za wyrozumiałość, cierpliwość i wszechstronne wsparcie w czasie pisania pracy.

Pracę dedykuję Mojej Rodzinie

Spis treści

1. WSTĘP	11
1.1. Epidemiologia	11
1.2. Etiopatogeneza cukrzycy typu 1	12
1.3. Nefropatia cukrzycowa	13
1.4. Retinopatia cukrzycowa	16
1.5. Patogeneza nefropatii i retinopatii cukrzycowej	18
2. CEL PRACY	28
3. MATERIAŁ I METODY	29
3.1. Pacjenci i dane kliniczne	29
3.2. Badania biochemiczne	30
3.3. Badanie okulistyczne	31
3.4. Badania immunologiczne przesiewowe w kierunku celiakii i autoimmunologicznego zapalenia tarczycy	31
3.5. Badanie aktywności enzymu N-acetylo- β -D-glukozaminidazy i jego izoenzymu A i B	32
3.6. Badania poziomu cytokin: TNF- α , IL-6, VEGF, IL-10, IL-12	32
3.7. Ustalenie kryteriów podziału pacjentów na grupy	34
3.8. Metody statystyczne	37
4. WYNIKI	38
4.1. Parametry kliniczne, biochemiczne i immunologiczne u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania i po 4 latach obserwacji	38
4.2. Analiza porównawcza parametrów klinicznych, biochemicznych i immunologicznych u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania oraz u dzieci zdrowych	41
4.3. Analiza porównawcza parametrów klinicznych, biochemicznych i immunologicznych u dzieci z cukrzycą typu 1 z uwzględnieniem poziomu HbA1c	46
4.4. Analiza korelacji HbA1c z parametrami klinicznymi, biochemicznymi i immunologicznymi u dzieci z cukrzycą typu 1	51
4.5. Charakterystyka kliniczna, biochemiczna i immunologiczna pacjentów na początku choroby, z uwzględnieniem rozwoju mikroalbuminurii	54
4.6. Analiza porównawcza parametrów klinicznych, biochemicznych i immunologicznych pacjentów z mikroalbuminurią i bez mikroalbuminurii z grupą dzieci zdrowych	58
4.7. Charakterystyka kliniczna, biochemiczna i immunologiczna pacjentów z cukrzycą typu 1 po 4 latach obserwacji z uwzględnieniem rozwoju mikroalbuminurii	62
4.8. Ocena porównawcza parametrów klinicznych, biochemicznych i immunologicznych pacjentów z utrwaloną mikroalbuminurią, z progresją oraz z regresją mikroalbuminurii	66

4.9. Ocena porównawcza parametrów klinicznych, biochemicznych i immunologicznych pacjentów z progresją, z regresją mikroalbuminurii oraz bez udokumentowanej mikroalbuminurii	70
4.10. Analiza korelacji TNF- α z parametrami klinicznymi, biochemicznymi i immunologicznymi u pacjentów z cukrzycą typu 1)	73
4.11. Analiza korelacji IL-6 z parametrami klinicznymi i biochemicznymi i immunologicznymi u pacjentów z cukrzycą typu 1	87
4.12. Analiza korelacji IL-12 z parametrami klinicznymi, biochemicznymi i immunologicznymi u pacjentów z cukrzycą typu 1	87
4.13. Analiza korelacji IL-10 z parametrami klinicznymi, biochemicznymi i immunologicznymi u pacjentów z cukrzycą typu 1	94
4.14. Analiza korelacji VEGF z parametrami klinicznymi i biochemicznymi i immunologicznymi u pacjentów z cukrzycą typu 1	101
4.15. Charakterystyka kliniczna, biochemiczna i immunologiczna pacjentów na początku badania z uwzględnieniem rozwoju retinopatii cukrzycowej	105
4.16. Analiza porównawcza parametrów klinicznych, biochemicznych i immunologicznych pacjentów z udokumentowaną retinopatią i bez zmian w narządzie wzroku z grupą dzieci zdrowych	109
4.17. Charakterystyka kliniczna, biochemiczna i immunologiczna pacjentów z cukrzycą typu 1 po 4 latach obserwacji z uwzględnieniem rozwoju retinopatii cukrzycowej	113
4.18. Analiza parametrów klinicznych, biochemicznych i immunologicznych pacjentów z cukrzycą typu 1, u których zarówno na początku badania, jak i po 4 latach obserwacji nie udokumentowano nefropatii i retinopatii cukrzycowej	116
4.19. Czynniki ryzyka rozwoju nefropatii cukrzycowej	120
4.20. Czynniki ryzyka rozwoju retinopatii cukrzycowej	121
4.21. Wyniki leczenia inhibitorami konwertazy angiotensyny	122
5. DYSKUSJA	134
6. WNIOSKI	156
7. STRESZCZENIE	158
8. SUMMARY	162
9. PIŚMIENNICTWO	167
10. ZAŁĄCZNIK	192
10.1. Podział badanych dzieci z cukrzycą typu 1 na grupy	192

SPIS SKRÓTÓW

ACE-I	– inhibitory konwertazy angiotensyny (<i>angiotensin-converting enzyme inhibitors</i>)
AGEs	– końcowe produkty glikacji (<i>advanced glycation end products</i>)
CRP	– białko C-reaktywne (<i>C-reactive proteine</i>)
GFR	– wskaźnik filtracji kłębkowej (<i>glomerular filtration rate</i>)
HbA1c	– hemoglobina glikowana (<i>glycosylated hemoglobin</i>)
HLA	– układ zgodności tkankowej (<i>human leukocyte antygen</i>)
IGF-1	– insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (<i>insulin-like growth factor 1</i>)
IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13	interleukiny – 2,4,5,6,10,12,13 (<i>interleukins</i>)
INF γ	– interferon gamma
MCP-1	– chemotaktyczne białko dla monocytów (<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>)
NAG	– N-acetylo- β -D-glukozaminidaza (<i>N-acetyl-beta-D-glucosaminidase</i>)
NO	– tlenek azotu (<i>nitric oxide</i>)
NOS	– syntaza tlenku azotu (<i>nitric oxide synthase</i>)
ROS	– wolne rodniki tlenowe (<i>reactive oxygen species</i>)
TGF β	– transformujący czynnik wzrostu β (<i>transforming growth factor β</i>)
TNF- α	– czynnik martwicy nowotworu- α (<i>tumor necrosis factor-α</i>)
TG	– tyreoglobulina (<i>tyreoglobulin</i>)
TPO	– peroksydaza tarczycowa (<i>thyroid peroxidase</i>)
tTG	– transglutaminaza tkankowa (<i>tissue transglutaminase</i>)
VEGF	– czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (<i>vascular endothelial growth factor</i>)

1. WSTĘP

1.1. EPIDEMIOLOGIA

Cukrzyca jest chorobą znaną od ponad 3500 lat, jednak dopiero odkrycie insuliny w 1920 roku umożliwiło leczenie chorych na cukrzycę i stało się podstawą rozwoju współczesnej diabetologii.

Badania epidemiologiczne prowadzone w wielu krajach świata wskazują na postępujący od ponad 50 lat wzrost zapadalności na cukrzycę na wszystkich kontynentach. Zachorowalność na cukrzycę przybrała postać epidemii. Obecnie na cukrzycę choruje na świecie 195 milionów ludzi, a według szacunków, do roku 2025 wzrośnie ona do 334 milionów, co będzie stanowiło 6,3% globalnej populacji [1]. Najwyższy wskaźnik zapadalności na cukrzycę typu 1 na świecie obserwuje się w Finlandii (45/100 000 mieszkańców/rok). Jest on 4-krotnie wyższy niż notowany 1953 roku. Ten trend wzrostowy utrzymuje się nadal, dlatego ocenia się, że w 2020 roku wskaźnik zapadalności w Finlandii wyniesie 55/100 000 mieszkańców/rok. Natomiast najniższy wskaźnik zapadalności w Europie występuje w Rumunii (5/100 0000 mieszkańców) [2, 3]. Populacja polska jeszcze do 1998 roku należała do krajów o niskiej zapadalności na cukrzycę typu 1. W ciągu ostatnich 10 lat nastąpił w Polsce dynamiczny wzrost zachorowań na cukrzycę typu 1, co powoduje stopniowe przesuwanie Polski w klasyfikacji zapadalności na tę chorobę na poziom średni [4, 5]. Potwierdzeniem tego stwierdzenia są opublikowane w 2007 roku wyniki własnych badań epidemiologicznych dotyczących zapadalności na cukrzycę typu 1 w populacji wieku rozwojowego w województwie pomorskim [6]. Udokumentowano, iż w okresie od 1998 do 2006 roku wystąpił prawie 2-krotny wzrost wskaźnika zapadalności na cukrzycę typu 1 w grupie dzieci do 15 roku życia w województwie pomorskim (1998 – 10,4 vs 2006 – 20,5). Szczególnie niepokojący jest w ostatnich latach dynamiczny wzrost zachorowań wśród dzieci najmłodszych w wieku od 0 do 4 lat [7]. W ciągu ostatnich 3 lat w województwie pomorskim nastąpił ponad 2,5-krotny wzrost wskaźnika zapadalności na cukrzycę typu 1 w tej grupie dzieci [6]. Obecnie ocenia się, że cukrzyca należy obok astmy oskrzelowej do najczęstszych chorób przewlekłych wieku rozwojowego.

1.2. ETIOPATOGENEZA CUKRZYCY TYPU 1

Patogeneza cukrzycy typu 1 nie jest dotychczas w pełni wyjaśniona. Wiele danych przemawia za udziałem kompleksu czynników środowiskowych i genetycznych w przełamaniu tolerancji na własne antygeny i wzbudzeniu komórkowej oraz humoralnej odpowiedzi autoimmunologicznej na niektóre struktury komórek β trzustki [8]. Uważa się, że geny DR i DQ II klasy HLA są odpowiedzialne za 40–50% zachorowań na cukrzycę typu 1 [9-12]. Szeroko prowadzone badania genetyczne udowodniły rolę innych genów predysponujących do rozwoju cukrzycy typu 1 [13-17]. Wśród czynników środowiskowych istotną rolę w patogenezie cukrzycy typu 1 odgrywają infekcje wirusowe i bakteryjne [18-21], białka zwierzęce i roślinne w diecie niemowląt, suplementacja witaminy D3 [22-23] oraz chemikalia, barwniki i konserwanty stosowane w produktach żywnościowych [24-25].

Poszukiwania udziału poszczególnych czynników sprawczych w patogenezie cukrzycy typu 1 były przedmiotem badań własnych i innych autorów [26-29]. Ich wyniki dowodzą, iż kluczową rolę w procesie autoimmunologicznej autoagresji kierowanej przeciwko antygenom komórek β wysp trzustkowych odgrywa zaburzenie równowagi między subpopulacjami limfocytów pomocniczych Th1 i Th2 na korzyść limfocytów Th1. Limfocyty Th1 wykazują cechy komórek autoreaktywnych, posiadając zdolność sekrecji IL-2, INF- γ , TNF- α , aktywacji makrofagów, limfocytów cytotoksycznych (CD8+) i komórek NK [30]. Limfocyty subpopulacji Th2, produkujące między innymi IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 indukują odpowiedź humoralną i produkcję przeciwciał, a także spełniają funkcję komórek regulatorowych, hamując aktywność limfocytów Th1 [32].

Badania dotyczące produkcji cytokin profilu Th2 sugerują, iż wyższa zdolność do sekrecji cytokin IL-4, IL-10 może istotnie zmniejszyć ryzyko zachorowania na cukrzycę typu 1 u osób z rodzinnym obciążeniem tą chorobą [31, 33].

W ciągu ostatnich lat podejmowane są próby odpowiedzi na pytanie w jakim stopniu mediatory swoistej odpowiedzi immunologicznej odpowiedzialne za rozwój cukrzycy typu 1 mogą mieć wpływ na uszkodzenie naczyń i innych narządów u dzieci z długotrwałą cukrzycą typu 1. Autorzy nielicznych jeszcze prac z tej dziedziny sugerują, iż procesy immunologiczne odpowiedzialne za zniszczenie komórek β wysp trzustki we

wczesnym okresie choroby utrzymują aktywność w cukrzycy długotrwałej i mogą brać udział w rozwoju późnych powikłań w tym nefropatii i retinopatii cukrzycowej [34].

1.3. NEFROPATIA CUKRZYCOWA

Nefropatia cukrzycowa rozwija się u 50-60% chorych na cukrzycę typu 1 i jest jedną z najczęstszych przyczyn niewydolności nerek występującej u osób dorosłych [35-38]. Analizy statystyczne przyczyn przewlekłej niewydolności nerek przeprowadzone w naszym kraju i na świecie wykazują, że wśród pacjentów leczonych nerkoza-
stępczo przeszło 50% stanowią chorzy z rozpoznaniem nefropatii cukrzycowej [39-41].

Mimo prowadzenia licznych badań patomechanizm rozwoju nefropatii cukrzycowej wciąż nie jest do końca wyjaśniony. Z jednej strony podkreśla się udział czynników genetycznych, z drugiej zaś strony, wpływ istniejących zaburzeń metabolicznych w przebiegu cukrzycy typu 1. Wykazano 2-krotny wzrost ryzyka rozwoju nefropatii u chorych na cukrzycę typu 1, będących nosicielami antygenu HLA-A2 [42-43]. W metaanalizie obejmującej 7383 chorych na cukrzycę typu 1, opracowanej przez Grzeszczaka oraz w metaanalizie przeprowadzonej przez Fujisawa wykazano, iż nefropatia cukrzycowa istotnie częściej rozwija się u nosicieli polimorfizmu DD genu ACE oraz polimorfizmu RsaI genu receptora insuliny i genu endoteliny [44-45]. Podejrzewa się także związek niektórych polimorfizmów genu hemochromatozy, reduktazy metyloctetrahydrofolanu, inhibitora aktywatora plazminogenu-1, genu śródbłonkowej syntazy tlenu azotu [46], genu transformującego czynnika wzrostu $\beta 1$ [47], receptora końcowych produktów zaawansowanej glikacji [48], oraz genu GLUT1 ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nefropatii cukrzycowej [49].

Aktualny stan wiedzy uniemożliwia wpływ na podatność genetyczną u poszczególnych chorych na cukrzycę typu 1, warunkującej u nich zwiększone ryzyko rozwoju nefropatii cukrzycowej. Dlatego też dążenie do identyfikacji czynników biorących udział w uszkodzeniu nerek w pierwszych latach choroby może przyczynić się do zastosowania odpowiedniego postępowania terapeutycznego, które być może opóźni rozwój przewlekłych powikłań naczyniowych, a nawet nie dopuści do ich powstania.

1.3.1. Mikroalbuminuria

Jednym z uznanych powszechnie markerów identyfikujących osoby zagrożone wystąpieniem nefropatii cukrzycowej jest mikroalbuminuria [50,51], na podstawie której opracowano klasyfikację cukrzycowej choroby nerek [52]. Utrwalona stała mikroalbuminuria występuje dopiero w III stadium powikłań cukrzycowych. W II stadium nefropatii cukrzycowej wydalanie albumun w moczu jest zwykle w granicach normy fizjologicznej. Również wartość wskaźnika przesączania kłębkowego (GFR) oraz ciśnienie tętnicze najczęściej są prawidłowe. Jedynie w badaniu histologicznym występują zmiany morfologiczne charakteryzujące się: przerostem kłębuszków nerkowych, pogrubieniem błony podstawnej kłębuszka nerkowego, pogrubieniem błony podstawnej cewek nerkowych, rozplemem komórek mezangium i niewielkim poszerzeniem przestrzeni śródmiąższowej [53-55]. Dopiero w III stadium nefropatii cukrzycowej stwierdza się dalsze pogrubienie błony podstawnej i ekspansję macierzy mezangium oraz mikroalbuminurię i stopniowy wzrost ciśnienia tętniczego krwi. Tak więc obecność mikroalbuminurii w konfrontacji z wynikami badań anatomopatologicznych nie stanowi prognozy rozwoju nefropatii. Jest ona wynikiem znacznego uszkodzenia kłębuszków nerkowych, którego pojawienie się najczęściej wykracza poza wiek dzieciństwa. Dlatego celowe jest poszukiwanie innych niż mikroalbuminuria markerów zapowiadających postępujący rozwój nefropatii cukrzycowej u dzieci z cukrzycą typu 1.

1.3.2. Cystatyna C

W ciągu ostatnich lat podnoszona jest rola cystatyny C w diagnostyce chorób nerek. Cystatyna C jest nieglikozylowanym białkiem o masie cząsteczkowej 13.300 daltonów. Jest ona zbudowana ze 120 reszt aminokwasowych, tworzących pojedynczy łańcuch polipeptydowy, w którym znajdują się dwa mostki dwusiarczkowe. Należy do rodziny białek, które pełnią funkcję inhibitorów proteaz cystynowych. Jest ona produkowana przez większość komórek jądrzastych. Występuje we krwi, moczu, ślinie, płynie mózgowo-rdzeniowym, płynie opłucnowym, mleku kobiecym. Jej obecność stwierdzono także w neuronach kory mózgowej, komórkach rdzenia nadnerczy i w gruczoł-

wej części przysadki mózgowej [56-57]. Stężenie cystatyny C w surowicy krwi u osób zdrowych wykazuje niewielkie wahania w ciągu doby [58-60] i nie jest uzależnione od płci i wieku oraz BMI pacjenta [56,61-62].

W dotychczas przeprowadzonych badaniach wykazano, iż cystatyna C jest czulszym parametrem oceniających funkcję nerek, niż poziom kreatyniny oraz 24-godzinny klirens kreatyniny [63-70]. Ze względu na niską masę cząsteczkową cystatyna C jest filtrowana w kłębuszkach nerkowych i ulega prawie całkowitej reabsorpcji w proksymalnych cewkach nerkowych, więc tylko nieznaczna jej ilość jest wydalana z moczem [66].

Wzrost poziomu cystatyny C w surowicy krwi obserwuje się u chorych ze zmniejszonym przesączaniem kłębuszkowym i jest on proporcjonalny do spadku przesączania kłębuszkowego (*glomerular filtration rate* – GFR) [71-72]. Liczni autorzy udokumentowali w swoich pracach, iż stężenie cystatyny C wykazuje bardzo dobrą korelację z GFR [73-77]. Wyniki badań Tana [66] oraz Newmana [67] wykazały istotną ujemną korelację pomiędzy poziomem cystatyny C a wielkością GFR. Inni autorzy opisali wzrost stężenia cystatyny C w przebiegu kłębkowego zapalenia nerek, zespołu nerczycowego, cukrzycy typu 2, chorób sercowo-naczyniowych oraz choroby nowotworowej [78-80]. Dotychczas nieliczne są prace badające przydatność diagnostyczną cystatyny C u dzieci z cukrzycą typu 1 [81]. Shimizu i wsp wykazali istotny związek pomiędzy poziomem cystatyny C w surowicy a stadium rozwoju nefropatii cukrzycowej w postaci mikro- i makroalbuminurii, ale tylko u pacjentów z cukrzycą typu 2 [82]. Stąd pojawia się pytanie, czy monitorowanie poziomu cystatyny C u dzieci z cukrzycą typu 1 może pomóc w przewidywaniu rozwoju nefropatii cukrzycowej oraz czy cystatyna C może być wcześniejszym markerem uszkodzenia funkcji nerek niż mikroalbuminuria?

1.3.3. N-acetylo-β-D-glukozaminidaza

Badania oceniające przydatność diagnostyczną aktywności N-acetylo-β-D-glukozaminidazy (NAG) do oceny stopnia rozwoju nefropatii cukrzycowej u dzieci wykazały, iż enzym ten jest czułym markerem uszkodzenia nerek w przebiegu cukrzycy typu 1 [83-84]. Enzym NAG występuje w lizosomach większości komórek organizmu,

a szczególnie duża jego ilość znajduje się w komórkach nabłonka kanalików nerkowych proksymalnych. Natomiast aktywność enzymu NAG w strukturach kłębków nerkowych jest kilkakrotnie niższa. Enzym ten występuje w organizmie w kilku postaciach molekularnych. Najlepiej poznane są dwa główne izoenzymy NAG: A i B. Izoenzymy NAG są obecne w tkankach i płynach biologicznych w różnych proporcjach. W przypadku surowicy krwi izoenzym B stanowi niewielką część aktywności całkowitej NAG. Natomiast izoenzym A przeważa stanowiąc ponad 80% aktywności całkowitej NAG. Ze względu na dużą masę cząsteczkową izoenzymy NAG nie przechodzą przez nieuszkodzoną błonę podstawną kłębka nerkowego [85-86]. Wobec tego enzym obecny w moczu pochodzi z uszkodzonego nabłonka kanalików proksymalnych, szczególnie znacznie wzrasta aktywność izoenzymu B. Ocena aktywności enzymu NAG i jego izoenzymu B w moczu znalazła zastosowanie jako czuły i wczesny wskaźnik upośledzenia czynności nabłonka kanalików proksymalnych w przebiegu wielu chorób [87-88].

Opublikowane w latach 2000-2004 badania własne nad aktywnością enzymu N-acetylo-beta-D-glukozaminidazy (NAG) i jego izoenzymów A i B w surowicy krwi i w moczu wskazują na możliwość zastosowania oznaczenia aktywności tego enzymu również u dzieci z cukrzycą typu 1, w celu przewidywania rozwoju wczesnych zmian naczyniowych w przebiegu tej choroby [89-91]. Wnioski z prowadzonych badań pozwalają na sformułowanie tezy, iż w przebiegu cukrzycy typu 1 początkowo dochodzi do uszkodzenia cewek nerkowych, a następnie do powstania zmian patologicznych w błonie podstawnej kłębuszka nerkowego. Dalsza obserwacja dynamiki zmian w aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów badanej u dzieci z cukrzycą typu 1 przed pojawieniem się u nich mikroalbuminurii, być może pozwoli na określenie wartości aktywności tego enzymu jako czynnika przepowiadającego wystąpienie nefropatii cukrzycowej.

1.4. RETINOPATIA CUKRZYCOWA

Liczni autorzy podkreślają w swoich pracach, że mikroalbuminuria jest nie tylko objawem rozwijającej się nefropatii cukrzycowej, ale również odzwierciedla uogólnione uszkodzenie naczyń włosowatych innych narządów, w tym narządu wzroku [92-93].

Retinopatia cukrzycowa stanowi najczęstszą przyczynę utraty wzroku u pacjenta, a u znacznej części chorych istotnie upośledza ostrość widzenia. Zmiany na dnie oka jawne klinicznie w większości przypadków nie występują przed upływem 5 lat od początku trwania cukrzycy [94]. Natomiast po 10 latach trwania choroby objawy retinopatii cukrzycowej występują już u 50%, a po 20-30 latach aż u 90% chorych na cukrzycę typu 1 [95]. Progresja zmian na dnie oka nie we wszystkich przypadkach bezpośrednio koreluje z ostrością wzroku. Natomiast w przypadkach pogorszenia ostrości wzroku zastosowanie nawet najbardziej optymalnego leczenia nie pozwala na poprawę widzenia u chorego [96]. Wczesne wykrycie tendencji do rozwoju retinopatii cukrzycowej, jeszcze przed powstaniem widocznych zmian na dnie oka, jest więc niezwykle ważne w zapobieganiu pogorszenia widzenia i monitorowaniu powikłań w obrębie narządu wzroku zwłaszcza u dzieci i młodzieży.

Wyniki prowadzonych badań nad predyspozycją genetyczną do rozwoju retinopatii cukrzycowej są niejednoznaczne. Większość opublikowanych badań obejmowało zbyt małą liczbę pacjentów, a ich wyniki opierały się na niewystarczająco wystandaryzowanych kryteriach. Ponadto wiele genów kandydatów do rozwoju retinopatii cukrzycowej jest jednocześnie zaangażowanych w prawidłowe funkcjonowanie i regulację mikrokrążenia siatkówkowego. Nie mniej jednak sugeruje się genetyczną predyspozycję do rozwoju retinopatii cukrzycowej, związaną z obecnością antygenów HLA DR3/DR4 [97]. Prowadzone są ponadto badania polimorfizmów genów związanych z patogenezą retinopatii cukrzycowej genu VEGF oraz polimorfizmu genu VEGF [98-99], receptora końcowych produktów zaawansowanej glikacji [100], reduktazy aldozowej [101], genu enzymu konwertującego angiotensynę [102], genu syntazy tlenu azotu [103] oraz genu międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej 1 [104].

Na obecnym etapie wiedzy nie potrafimy zmienić podatności genetycznej u chorego w kierunku rozwoju nie tylko nefropatii, ale również retinopatii cukrzycowej. Zakładamy natomiast, że identyfikacja czynników biorących udział w uszkodzeniu narządu wzroku w pierwszych latach choroby pozwoli na ich eliminację, co w efekcie może spowodować opóźnienie wystąpienia późnych powikłań naczyniowych w postaci pogorszenia ostrości widzenia lub utraty wzroku.

Zanim dojdzie do powstania zmian na dnie oka widocznych za pomocą oftalmoskopii lub angiografii fluoresceinowej, w badaniu immunohistopatologicznym widoczne są zmiany morfologiczne w obrębie tętniczek przedwłosowatych, włosniczek i drobnych naczyń żylnych o średnicy poniżej 100 μm . W początkowym okresie rozwoju retinopatii cukrzycowej dochodzi do pogrubienia błony podstawnej małych naczyń, zwężenia i zamykania naczyń, zaniku pericytów, osłabienie i rozdęcie ścianek drobnych naczyń i rozwoju mikroaneuryzmatów oraz proliferacji komórek śródbłonna. Ponadto dochodzi do zmian czynnościowych w naczyniach włosowatych, zwiększenia przepuszczalności ich ściany i załamania się bariery krew-siatkówka. Pojawienie się obszarów siatkówki pozbawionych dopływu krwi powoduje przewlekłe niedotlenienie siatkówki, wzrost produkcji czynników wzrostu, które z kolei indukują rozplem nowych naczyń i towarzyszącej im tkanki włóknistej na powierzchni siatkówki i tarczy nerwu II [105]. Jedynie poznanie patogenezы tego zjawiska pozwoli na minimalizację częstości występowania oraz stopnia nasilenia postępujących zmian naczyniowych.

1.5. PATOGENEZA NEFROPATII I RETINOPATII CUKRZYCOWEJ

Jeszcze nie tak dawno patogenezę nefropatii i retinopatii cukrzycowej rozpatrywano oddzielnie. Obecnie liczni autorzy prac uważają, iż patogenezа mikronaczyniowych powikłań cukrzycy jest wspólna i związana z pierwotnym uszkodzającym działaniem hiperglikemii na śródbłonek naczyń włosowatych kłębuszka nerkowego i narządu wzroku [92,105-108].

Już wyniki wcześniejszych szeroko prowadzonych badań wykazały, iż wyrównanie glikemii odgrywa istotną rolę w zapobieganiu lub zwolnieniu progresji nefropatii i retinopatii w przebiegu cukrzycy typu 1 [109-110]. Rudberg i wsp. stwierdzili u młodzieży chorującej na cukrzycę typu 1, iż nasilenie zmian morfologicznych w kłębuszkach nerkowych w momencie wystąpienia mikroalbuminurii było pozytywnie skorelowane ze średnim poziomem HbA1c w poprzedzających 5 latach choroby [111]. Prospektywne badania kliniczne Control and Complication Trial Research Group oraz Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) wykazały, iż prawidłowe wyrównanie metaboliczne zmniejsza częstość wystąpienia mikroalbuminurii oraz jawnej nefropatii u

chorych z cukrzycą typu 1 o około 50%, a także zmniejsza ryzyko retinopatii o 76% w prewencji pierwotnej i hamuje postęp retinopatii u 54% chorych z cukrzycą typu 1 z występującymi już zmianami na dnie oka [112].

Powszechnie uważa się, iż obecność końcowych produktów glikozylacji (AGEs – *advanced glycation end products*) koreluje z rozwojem późnych powikłań cukrzycy, zaś ich produkcja indukowana jest przez hiperglikemię [113]. Natomiast wciąż przedmiotem badań poszukiwany jest patomechanizm rozwoju nefropatii i retinopatii cukrzycowej z udziałem AGEs.

1.5.1. Końcowe produkty glikacji białek

Wykrycie AGEs w ścianach patologicznie zmienionych naczyń krwionośnych kłębuszka nerkowego i siatkówki izolowanych od osób chorych na cukrzycę typu 1 dowodzi o udziale końcowych produktów glikacji w rozwoju nefropatii i retinopatii cukrzycowej [114-115]. Na skutek glikacji białek błony podstawnej włósniczek kłębuszka nerkowego i siatkówki dochodzi do powstania mostków dwusiarczkowych oraz wiązań krzyżowych między nitkami kolagenu, co zmienia strukturę błony. Zwiększona liczba wiązań krzyżowych jest prawdopodobnie przyczyną wiązania krążących białek do błony podstawnej naczyń, zwężenia ich światła oraz zmniejszenia elastyczności [116]. Nieliczne prace wskazują na możliwość udziału AGEs w rozwoju nefropatii i retinopatii cukrzycowej poprzez zwiększenie produkcji VEGF [117-121]. Murata i wsp. [122] wykazali w swoich badaniach, iż zwiększonemu stężeniu AGEs w siatkówce u pacjentów z cukrzycą typu 1 z objawami retinopatii cukrzycowej, towarzyszyła zwiększona produkcja VEGF. Chiarelli i wsp. [120] wskazują na możliwość udziału AGEs w rozwoju początkowego stadium retinopatii cukrzycowej poprzez wpływ na uszkodzenie bariery naczyniowej włósniczek siatkówki w wyniku zwiększonej ekspresji VEGF w obrębie narządu wzroku. Natomiast Lu i wsp. [118] wyjaśniają, iż podwyższone stężenie VEGF u pacjentów z cukrzycą typu 1 jest wynikiem zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu (ROI – *reactive oxygen intermediates*) po połączeniu się AGEs z receptorami na komórkach śródbłonna. W badaniach eksperymentalnych na zwierzętach z cukrzycą wykazano, iż wprowadzenie przeciwciał neutralizujących VEGF, zapobiega wzrostowi

przepuszczalności naczyń siatkówki, wywołanego hiperglikemią i hamuje rozwój retinopatii [123].

1.5.2. Naczyniowy czynnik wzrostu śródbłónka

W ciągu ostatnich lat podnoszona jest rola naczyniowego czynnika wzrostu śródbłónka (VEGF – *vascular endothelial growth factor*) jako czynnika odgrywającego istotną rolę w patogenezie proliferacji naczyń [124-125]. VEGF charakteryzuje się silnym działaniem angio- i mitogennym, zaangażowanym w proces zarówno fizjologicznej, jak i patologicznej angiogenezy. Już w rozwoju płodowym wykryto obecność VEGF w komórkach trofoblastu, co wskazuje na rolę tej substancji w indukcji wzrostu naczyń w łożysku [126]. W trakcie rozwoju nerki VEGF jest najważniejszym czynnikiem, który umożliwia rozwój cewek i kłębuszków naczyniowych [127]. *In vivo* VEGF mRNA stwierdzono w komórkach pęcherzykowych płuc, mięśniu sercowym, hepatocytach, mózgu, aortalii, komórkach kory nadnerczy, komórkach kłębuszka nerkowego, komórkach nabłonka kanalikula proksymalnego oraz perycytach [126,128]. Badania przeprowadzone w ostatnich latach ujawniły kluczową rolę tej cytokiny w patogenezie choroby Kawasaki, astmie, reumatoidalnego zapalenia stawów, łuszczycy, miażdżycy tętnic wieńcowych [129-130]. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu ma również znaczenie w tworzeniu nowych patologicznych naczyń w obrębie guzów nowotworowych [126,131]. Piśmiennictwo z ostatnich lat wskazuje na istotny udział VEGF w patogenezie mikroangiopatii cukrzycowej [132-134]. W badaniach na zwierzętach stwierdzono związek pomiędzy stopniem niedokrwienia siatkówki a wydzielaniem VEGF oraz wykazano udział VEGF w powstawaniu neowaskularyzacji zarówno w obrębie rogówki jak i naczyń siatkówki [135]. W tych samych badaniach wskazano, iż do najważniejszych czynników zwiększających stężenie VEGF należą hipoksja, insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1), wolne rodniki tlenowe oraz końcowe produkty glikozylacji.

VEGF stymuluje proliferację i migrację komórek śródbłónka [136-137] oraz zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych [138-139]. Ponadto indukuje produkcję tkankowej kolagenozy, chemotaksję dla makrofagów i monocytów. Uważa się, że jednym z mechanizmów, w wyniku których VEGF prowadzi do rozwoju nefropatii i

retinopatii cukrzycowej jest stymulacja syntezy białka chemotaktycznego dla monocytów MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) [140-141]. Oddziaływujące na siebie kolejno AGEs, VEGF i MCP-1 mają wpływ nie tylko na migrację leukocytów do naczyń siatkówki, ale również działają chemotaktycznie na komórki NK, limfocyty T. Ostatecznie dochodzi do obliteracji światła tych naczyń, niedotlenienia i niedokrwienia siatkówki. Niedotlenienie z kolei w krótkim czasie zwiększa nawet 30-krotnie ekspresję VEGF mRNA [142]. W badaniach Kanasaki i wsp wykazano, iż stopień ekspresji VEGF mRNA w kłębkach nerkowych był proporcjonalny do ilości nowych naczyń zlokalizowanych wokół tętniczek doprowadzających i odprowadzających kłębuszka nerkowego [143]. Z kolei Cha i wsp w badaniach eksperymentalnych w materiale biologicznym uzyskanym z biopsji nerek stwierdzili istotnie wyższą ekspresję tej cytokiny w komórkach kłębuszka nerkowego i komórkach nabłonka kanalikula proksymalnego zaawansowanej nefropatii cukrzycowej niż w początkowym stadium choroby [144]. Dotychczasowe badania kliniczne nad rolą VEGF w rozwoju nefropatii i retinopatii cukrzycowej dotyczą głównie osób dorosłych i częściej pacjentów z rozpoznaniem cukrzycy typu 2 [145] oraz w zaawansowanym stadium mikroangiopatii cukrzycowej. Wstępne badania własne dotyczące dzieci z rozpoznaniem cukrzycy typu 1 wykazały istotny wzrost poziomu VEGF w surowicy krwi nie tylko w grupie dzieci z cukrzycą typu 1 i retinopatią nieproliferacyjną oraz mikroalbuminurią, ale również u pacjentów, u których w badaniu okulistycznym nie udokumentowano zmian w narządzie wzroku oraz nie stwierdzono mikroalbuminurii [146]. Uzyskane wyniki sugerują, iż VEGF może brać udział w rozwoju zmian naczyniowych w obrębie narządu wzroku i nerek u dzieci już w pierwszych latach choroby, kiedy ogólnie dostępne metody diagnostyczne nie wykrywają jeszcze zmian o charakterze retinopatii i nefropatii cukrzycowej. Istotne jest więc przeprowadzenie badań prospektywnych z udziałem VEGF u dzieci z cukrzycą typu 1 w celu obserwacji poziomu tego czynnika od początku choroby i opracowanie odpowiednich przedziałów wartości poziomu VEGF w zależności od stopnia zaawansowania rozwoju zmian w narządzie wzroku i nerkach. Pomiar poziomu VEGF u dzieci z cukrzycą typu 1 może stać się dodatkowym markerem w przewidywaniu rozwoju retinopatii i nefropatii cukrzycowej oraz wyprzedzić pojawienie się nieodwracalnych zmian w narządzie wzroku i nerkach.

Pomimo prowadzonych licznych badań, w patomechanizmie neowaskularyzacji wciąż istnieje wiele niewyjaśnionych zjawisk. Z jednej strony Tolentino i wsp. udowodnili w swoich badaniach, iż podanie egzogenego VEGF było wystarczające do rozwoju nowych naczyń w obrębie siatkówki [147]. Z drugiej zaś strony Schliegemann i wsp. wykazali na modelach zwierzęcych, iż obecność endo- lub egzogenego VEGF zawsze wywiera wpływ na przepuszczalność naczyń, nie zawsze jednak jest związana z powstaniem nowych naczyń [148]. Fakty te sugerują istotną rolę obok VEGF innych czynników zapalnych w procesie angiogenezy.

Publikacje z ostatnich lat coraz więcej uwagi poświęcają analizie markerów reakcji zapalnej w surowicy krwi u chorych na cukrzycę typu 1 w kontekście mikroangiopatii cukrzycowej [149-150]. W dotychczasowych badaniach własnych wykazałam istotnie wyższe wartości CRP, TNF- α oraz IL-6 u dzieci chorych na cukrzycę typu 1 powikłaną nefropatią i retinopatią cukrzycową w porównaniu do grupy dzieci, u których nie wykazano zmian w obrębie nerek i narządu wzroku [151-152]. Ponadto stwierdziłam istotną korelację pomiędzy poziomem TNF- α a VEGF w surowicy krwi [146]. Udokumentowany przeze mnie związek pomiędzy TNF- α a VEGF u dzieci z cukrzycą typu 1 został potwierdzony w badaniach Benjamina, w których wykazano, iż wzrost ekspresji VEGF obok hipoksji wzmagają cytokiny prozapalne, w tym TNF- α [153]. Z kolei Hernandez i wsp. oraz Yoo i wsp. [154,155], dowodzą, iż VEGF jest nie tylko czynnikiem wzrostowym śródbłonnów naczyń, ale także jednym z induktorów stanu zapalnego, poprzez stymulację syntezy TNF- α oraz IL-6.

1.5.3. Czynniki martwicy nowotworu- α

TNF- α jest pleiotropową cytokiną o charakterze prozapalnym. Oddziałuje na wiele komórek układu immunologicznego, wpływa na produkcję i wydzielanie innych cytokin, działa cytotoksycznie w stosunku do komórek β trzustki. Ponadto wiąże się z różnymi komórkami, w których może wywołać zarówno niszczący, jak i proliferacyjny odczyn poprzez aktywację granulocytów obojętnochłonnych, indukcję wykrzepiania na śródbłonie naczyń i stymulację wydzielania kolagenozy [156]. W badaniach klinicznych Doganay wywołał nekrozę śródbłonna i niedokrwienie siatkówki po poda-

niu TNF- α do wewnątrz ciała szklanego [157]. Z kolei Nakamura i wsp. stwierdził zwiększone uwalnianie TNF- α z błony podstawnej kłębuszków nerkowych oraz utrzymujący się wzrost ekspresji mRNA dla TNF- α w kłębuszkach nerkowych w dłuższej trwającej cukrzycy streptozotocynowej u szczurów [158]. Mechanizmy, które prowadzą do wzrostu aktywności TNF- α w cukrzycy typu 1 nie są do końca poznane. Prawdopodobnie miejscowa hipoksja oraz wysokie poziomy końcowych produktów zaawansowanej glikozylacji, które są związane z rozwojem mikroangiopatii cukrzycowej, mogą indukować obok VEGF również aktywację TNF- α , IL-6 [149,159]. W opublikowanych badaniach własnych wykazałam istotną dodatnią korelację pomiędzy poziomem HbA1c a poziomem TNF- α w surowicy krwi [160]. Ponieważ hemoglobina glikowana jest jednym z podstawowych biochemicznych wskaźników wyrównania metabolicznego cukrzycy, wykazany związek sugeruje, iż gorsze wyrównanie metaboliczne cukrzycy wiąże się z wyższym poziomem TNF- α w surowicy krwi. Końcowe produkty glikacji białek poprzez swoje receptory aktywują monocyty, makrofagi, komórki śródbłonna, które stają się wówczas źródłem prozapalnych cytokin [161].

Z jednej strony liczne prace dowodzą, iż prawidłowe wyrównanie metaboliczne u pacjentów z cukrzycą typu 1 jest kluczowym czynnikiem zapobiegającym rozwój zmian w narządzie wzroku w przebiegu choroby [109-110]. Z drugiej zaś strony ponowna analiza badania DCCT wykazała, iż u 10-15% pacjentów chorych na cukrzycę typu 1, pomimo dobrego wyrównania metabolicznego ($HbA1c < 6,8$) rozwinęła się retinopatia cukrzycowa, a u 40% pacjentów niedostatecznie wyrównanych metabolicznie ($HbA1c > 9,5\%$) nie rozwinęły się zmiany na dnie oka [162]. Fakty te dowodzą, iż obecność stanu zapalnego w długotrwałej cukrzycy typu 1 nie zawsze jest związany z nieprawidłowym wyrównaniem metabolicznym choroby, ale może być wynikiem trwającego procesu zapalnego powstałego podczas wczesnych faz rozwoju cukrzycy. W opublikowanych pracach własnych i doniesieniach wykazałam podwyższoną aktywność TNF- α , IL-6 w grupie dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 [163], a także w grupie pacjentów chorujących na cukrzycę typu 1, szczególnie w tej grupie dzieci, u których choroba była dodatkowo powikłana zmianami w narządzie wzroku i w nerkach [146,152]. Ponadto stwierdziłam istotną dodatnią korelację pomiędzy aktywnością TNF- α w surowicy krwi, stężeniem IL-6 w moczu a aktywnością izoenzymu NAG B w

moczu u dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 [163]. Powyższe wyniki sugerują, iż cytokiny odpowiedzialne za destrukcję komórek β trzustki mogą mieć wpływ na uszkodzenie nerek już we wczesnym okresie choroby.

Ocena aktywności NAG i jego izoenzymu B w moczu znalazła zastosowanie jako czuły i wczesny wskaźnik upośledzenia czynności nabłonka kanalików proksymalnych w przebiegu wielu chorób [87-88]. Patogeneza wzrostu aktywności enzymu NAG i jego izoenzymu B w moczu u chorych na cukrzycę typu 1 nie została w pełni poznana. W oparciu o wyniki badań własnych przypuszczam, że dysfunkcja kanalików nerkowych u dzieci zarówno w nowo rozpoznanej jak i długotrwałej cukrzycy może być powiązana z filtracją cytokin prozapalnych, w tym TNF- α przez błonę filtracyjną kłębuszka nerkowego. Badając wpływ wybranych cytokin na rozwój retinopatii i nefropatii cukrzycowej w kolejnych opublikowanych pracach wykazałam istotny wyższy poziom TNF- α w surowicy krwi u dzieci z cukrzycą typu 1 bez zmian w narządzie wzroku oraz udokumentowanej mikroalbuminurii, ale z podwyższoną aktywnością enzymu NAG i jego izoenzymu B w moczu w zestawieniu z dziećmi zdrowymi [151-152,160]. Mechanizm wzrostu enzymu NAG i jego izoenzymu B w moczu u pacjentów bez mikroalbuminurii tłumaczy się filtracją TNF- α o niskiej masie cząsteczkowej przez nieuszkodzoną błonę podstawną kłębuszka nerkowego. Cytokina ta może wywołać efekt cytotoksyczny poprzez indukcję syntazy tlenku azotu w komórkach kanalików nerkowych i produkcję tlenku azotu [164-165]. Na podstawie opublikowanych badań wstępnych uważam, że TNF- α może stać się istotnym spośród badanych parametrów wskaźnikiem uszkodzenia funkcji nerek, wyprzedzającym etap mikroalbuminurii i zmian w narządzie wzroku szczególnie, że w surowicy krwi osób zdrowych nie wykrywa się obecności tej cytokiny [146,151,160]. Dlatego wykazanie w badaniach longitudinalnych zróżnicowania poziomu TNF- α między chorymi na cukrzycę typu 1 w zależności od rozwoju powikłań daje szansę na uchwycenie wartości ryzyka ich rozwoju.

W ciągu ostatnich lat autorzy nielicznych jeszcze prac wskazują, iż produkcja cytokin antyzapalnych u osób z cukrzycą typu 1 jest prawdopodobnie niewystarczająca w celu ograniczenia efektu neurotoksycznego działania cytokin prozapalnych.

1.5.4. Interleukina 10

Znaczenie IL-10 dla rozwoju retinopatii i nefropatii cukrzycowej badano na modelach zwierzęcych. Badania Takeuchi i wsp. wykazały, iż pozbawienie zwierząt regulatorycznych limfocytów TCD4+CD25+ produkujących IL-10 rozwijało spontanicznie zapalenie siatkówki i naczyńówki. Natomiast złagodzenie objawów zapalenia wystąpiło po podaniu egzogennej IL-10. Terapia ta hamowała nadmierną sekrecję TNF- α oraz INF γ [166]. Natomiast w badaniach eksperymentalnych Kitching [167] i Choi [168] wykazano, iż podanie IL-10 chorym na cukrzycę zwierzętom hamowało proliferację komórek mezangium oraz redukowało albuminurię poprzez ograniczenie aktywności limfocytów Th1. Z kolei Noble w badaniach eksperymentalnych stwierdził zmniejszenie aktywności indukowanej syntazy tlenu azotu w makrofagach oraz ekspresji cząsteczek adhezyjnych po podaniu egzogennej IL-10 [169]. Dotychczas nie było prac w dostępnym piśmiennictwie na temat roli IL-10 w rozwoju mikroangiopatii cukrzycowej u dzieci.

W oparciu o przeprowadzone badania własne stwierdziłam u dzieci z cukrzycą typu 1 obniżony poziom IL-10 w surowicy krwi [151]. Aż 80% badanych pacjentów z objawami retinopatii i nefropatii cukrzycowej nie wykazywało aktywności tej cytokiny w surowicy krwi. Wstępna analiza poziomu IL-10 w grupie badanych dzieci z cukrzycą typu 1 o różnym stopniu zaawansowania zmian w narządzie wzroku i nerkach pozwala wnioskować, że wyższa aktywność sekrecyjna IL-10 może wiązać się z ochronną rolą przed powstaniem późnych powikłań. Prowadzenie dalszych badań oceniających negatywny wpływ niedoboru IL-10 na rozwój nefropatii i retinopatii u dzieci z cukrzycą typu 1 w pierwszych latach choroby być może pozwoli na określenie wartości IL-10 chroniącej przed rozwojem mikroangiopatii cukrzycowej.

1.5.5. Interleukina 12

Mimo ciągłych badań nad funkcją cytokin pro- i antyzapalnych, nieliczne są prace dotyczące udziału Interleukiny-12 (IL-12) w patogenezie cukrzycy typu 1 oraz rozwoju mikroangiopatii cukrzycowej. W dotychczasowych badaniach Szelachowska i wsp. wykazali istotne podwyższone stężenie IL-12 w surowicy krwi u krewnych I stopnia osób

chorych na cukrzycę typu 1, wskazując na zaangażowanie tej cytokiny w patogenezę cukrzycy typu 1 [170]. Również Głowacka i wsp. w swoich badaniach stwierdzili, iż nadprodukcja IL-12 przez neutrofile po stymulacji LPS może uczestniczyć w procesie zapalenia w przebiegu cukrzycy typu 1 [171].

IL-12 jest wielofunkcyjną cytokiną i w warunkach fizjologicznych jest ona wytwarzana głównie przez makrofagi, komórki dendrytyczne, keratynocyty, granulocyty i komórki tuczne. Stymuluje ona proliferację, aktywację i cytotoksyczność limfocytów T i komórek NK (*natural killer*) oraz wytwarzanie przez te komórki $\text{INF}\gamma$ oraz $\text{TNF-}\alpha$ [172]. IL-12 z jednej strony przyczynia się do rozwoju chorób autoimmunologicznych takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, stwardnienie rozsiane, cukrzyca typu 1 [173-175], z drugiej zaś strony w badaniach *in vitro* i *in vivo* odkryto, że cytokina ta ma silne właściwości przeciwnowotworowe [176]. Dlatego podjęto próby stosowania jej w leczeniu niektórych chorobach nowotworowych, czerniaku złośliwym, chłoniaku, raku jasnokomórkowym nerki [177-178]. Nieliczne badania przeprowadzone w ostatnich latach wskazują, że IL-12 może mieć właściwości antyangiogenne [179-180]. W badaniach *in vitro* wykazano, że utrzymanie równowagi między pro- i antyzapalnymi mediatorami pozwala na utrzymanie angiogenezy fizjologicznej, natomiast zaburzenie równowagi między czynnikami pro- i antyangiogennymi, na korzyść tych pierwszych, prowadzi do angiogenezy patologicznej [180].

W opublikowanych badaniach wstępnych Zorena i wsp wykazali w grupie dzieci z cukrzycą typu 1 powikłaną retinopatią istotny wyższy poziom $\text{TNF-}\alpha$ i VEGF oraz niższy poziom IL-12 w surowicy krwi w porównaniu do grupy pacjentów bez objawów retinopatii cukrzycowej [179,181]. Uzyskane wyniki sugerują, iż na wzrost produkcji $\text{TNF-}\alpha$ i VEGF może wpływać niedostateczny poziom IL-12. Być może równowaga między pro- i antyangiogennymi cytokinami jest jednym z czynników zapobiegających rozwój nefropatii i retinopatii cukrzycowej u tych dzieci. Istotne jest więc śledzenie poziomu cytokin pro- i antyzapalnych u dzieci z cukrzycą typu 1 w okresie przed pojawieniem się nefropatii i retinopatii cukrzycowej i opracowanie odpowiednich przedziałów wartości poziomu tych cytokin predysponujących do ujawnienia się późnych powikłań.

Wydaje się, iż w celu wyjaśnienia patogenezy nefropatii i retinopatii cukrzycowej należy prowadzić badania odnoszące poziom cytokin pro- i antyzapalnych, naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna, poziomu HbA1c do stanu klinicznego pacjenta chorego na cukrzycę typu 1. Niewątpliwie dodatkowym elementem ułatwiającym zrozumienie patogenezy zarówno nefropatii i retinopatii cukrzycowej będą badania śledzące zarówno dynamizm zmian biochemicznych i immunologicznych zachodzących u chorego, jak i postępujące zmiany w obrazie klinicznym schorzenia. Skojarzenie tych dwóch czynników może przyczynić się do poznania i lepszego zrozumienia zmian naczyniowych towarzyszących cukrzycy typu 1.

2. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było poszukiwanie wczesnych markerów rozwoju nefropatii i retinopatii u dzieci z cukrzycą typu 1 oraz określenie ich wartości prognostycznych

Cel pracy realizowano poprzez:

1. Ocenę związku pomiędzy poziomem enzymu N-acetylo- β -D-glukozaminidazy, cystatyny C a rozwojem mikroalbuminurii i zmian w narządzie wzroku u dzieci z cukrzycą typu 1
2. Analizę zależności pomiędzy stopniem wyrównania metabolicznego (HbA1c), poziomem naczyniowego czynnika wzrostu śródbłónka (VEGF), czynnika martwicy nowotworu (TNF- α), interleukiny 6 (IL-6) a rozwojem nefropatii i retinopatii cukrzycowej u dzieci.
3. Ocenę wpływu anti-angiogennej IL-12 i antyzapalnej IL-10 na rozwój nefropatii i retinopatii cukrzycowej u dzieci.
4. Określenie, który z badanych czynników immunologicznych i biochemicznych można uznać za prognostyczny dla ujawnienia się mikroalbuminurii i zmian w narządzie wzroku w przebiegu cukrzycy typu 1 u dzieci.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. PACJENCI I DANE KLINICZNE

Badaniami objęto chorych leczonych na Oddziale Diabetologii Dziecięcej Kliniki Pediatrii, Hematologii, Onkologii i Endokrynologii Akademii Medycznej w Gdańsku oraz Przyklinicznej Poradni Diabetologicznej dla Dzieci i Młodzieży Akademii Medycznej w Gdańsku, u których rozpoznano cukrzycę typu 1 na podstawie kryteriów American Diabetes Association [182].

Aby prześledzić dynamizm zachodzących zmian manifestacji objawów klinicznych oraz zaburzeń biochemicznych i immunologicznych towarzyszących cukrzycy typu 1 u analizowanych chorych, badania wykonano dwukrotnie w odstępie 4 lat: pierwszą ocenę dokonano w roku 2003, a drugiej w roku 2007. Badani w roku 2003 to grupa 202 dzieci (106 dziewcząt i 96 chłopców) w wieku $13,2 \pm 3,83$ lat, z czasem trwania choroby $4,62 \pm 3,38$ lat, zaś badani w roku 2007 to 185 pacjentów (95 dziewcząt i 90 chłopców) w wieku $16,4 \pm 3,9$ lat, z czasem trwania choroby $8,3 \pm 3,34$ lat.

Różnice w liczebności grup badanych w roku 2003 i 2007 spowodowane były wykluczeniem z analizy pacjentów, u których na podstawie badań klinicznych, biochemicznych, bakteriologicznych i immunologicznych w czasie 4 lat obserwacji stwierdzono schorzenia wątroby, układu moczowego, układu oddechowego oraz choroby o podłożu autoimmunologicznym. Ostatecznie do dalszej analizy poddano 185 pacjentów, u których, zarówno na początku badania, jak i po 4 latach obserwacji wykluczono choroby, które mogły mieć wpływ na aktywność badanych parametrów.

Uzyskane wyniki u chorych na cukrzycę typu 1 dzieci odniesiono do grupy kontrolnej. Stanowiło ją 86 zdrowych dzieci dobranych pod względem wieku $13,4 \pm 4,1$ lat i płci (52 dziewcząt i 34 chłopców), u których na podstawie wywiadu, badania klinicznego, badań immunologicznych oraz poziomu C-peptydu i HbA1c wykluczono oprócz wyżej wymienionych chorób również cukrzycę. W wywiadzie u dzieci zarówno chorych na cukrzycę typu 1, jak z grupy kontrolnej, nie stwierdzono infekcji w okresie 8–10 tygodni poprzedzających badania i w badaniu fizykalnym nie stwierdzono odchyleń od normy. Ponadto z badań wykluczono, zarówno z grupy dzieci chorych na cu-

krzycę typu 1 jak i z grupy kontrolnej pacjentów, u których indeks masy ciała, określony jako BMI (*body mass index* (kg/m²)) dla płci i wieku wyniósł powyżej 95 centyli.

Dzieci z cukrzycą typu 1 leczono insulinami humanizowanymi metodą intensywnej insulinoterapii. Dawka dobową insuliny wynosiła $0,87 \pm 0,23$ j/kg wagi ciała. Dodatkowo u pacjentów z cukrzycą typu 1 i z udokumentowaną mikroalbuminurią stosowano inhibitory konwertazy angiotensyny, Captopril w dawce 0,3-0,6 mg/kg. wagi ciała/dobę lub Enalapril w dawce 0,08-0,6 mg/kg. wagi ciała/dobę.

Na realizację badań będących przedmiotem pracy uzyskano zgodę rodziców badanych dzieci, jak też zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku (NKEBN/610/2003/2004).

3.2. BADANIA BIOCHEMICZNE

Stopień wyrównania metabolicznego cukrzycy oceniono na podstawie stężenia hemoglobiny glikozylowanej (HbA1c) oznaczonego w surowicy krwi metodą immunoturbidymetryczną używając Unimate 3 set (Hoffmann-La Roche AG, Basel, Switzerland). Poziom białka C-reaktywnego (CRP) oznaczono testem firmy Beckman Instr. Galway, Ireland. Poziom C-peptydu u wszystkich dzieci z cukrzycą typu 1 wynosił poniżej 0,5 ng/ml. Stężenie cholesterolu całkowitego, jego frakcji LDL- i HDL-cholesterolu oraz trójglicerydów oceniono z użyciem zestawów firmy CORMAY, Lublin, Polska. U wszystkich pacjentów oceniono dobowe wydalenie albumin w moczu metodą immunoturbidymetryczną przy użyciu testu Tina-quant® (Boehringer Mannheim GmbH, Germany). Jako mikroalbuminurię określono wydalenie albumin w moczu w granicach 30–299 mg/dobę w dwóch spośród trzech próbek jałowego moczu, zebranego w ciągu 6 miesięcy od chorego z wyrównaną cukrzycą bez cech klinicznych i laboratoryjnych kwasicy ketonowej [183-185]. Poziom cystatyny C w surowicy krwi oznaczono metodą immunoturbidymetryczną przy użyciu zestawu Cystatin C PET Kit (DAKO AS, Dania). Ponadto wykonano dobowy pomiar ciśnienia tętniczego. Średnie wartości ciśnienia tętniczego u dzieci oceniono w oparciu o siatki centylowe opracowane przez Borowskiego i wsp. [186]. Nadciśnienie tętnicze rozpoznano, jeśli co najmniej 30% całodobowych pomiarów ciśnienia skurczowego lub rozkurczowego przekraczało 95 centyli określonych norm przyjętych dla płci i wieku.

Badania biochemiczne wykonano w Akademickim Centrum Medycyny Laboratoryjnej Akademii Medycznej w Gdańsku (Kierownik Medycyny Laboratoryjnej: dr n. med. Zenon Jakubowski).

3.3. BADANIE OKULISTYCZNE

U wszystkich badanych dzieci z przewlekłą cukrzycą typu 1 wykonano badanie okulistyczne wg obowiązującej klasyfikacji [187]. Badanie dna oka przeprowadzono po podaniu kropli 1% Sol. Tropicaid, soczewką +90D firmy (Okular Instruments, USA). Oceny przedniego odcinka gałki ocznej dokonano lampą szczelinową (POPCON SL-8Z, JAPAN). Natomiast angiografię fluoresceinową (FL-A) wykonano kamerą cyfrową TOPCON IMAGE-NET 2000 (JAPAN) u pacjentów chorujących na cukrzycę typu 1 powyżej 5 lat.

Badania okulistyczne wykonano w Klinice Chorób Oczu w Akademii Medycznej w Gdańsku (Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Krystyna Raczyńska).

3.4. BADANIA IMMUNOLOGICZNE PRZESIEWOWE W KIERUNKU CELIAKII I AUTOIMMUNOLOGICZNEGO ZAPALENIA TARCZYCY

W celu wykluczenia chorób współistniejących z cukrzycą typu 1, celiakii i autoimmunologicznego zapalenia tarczycy [188], u wszystkich badanych pacjentów oznaczono poziom przeciwciał przeciwgliadynowych (AGA) w klasie IgA i IgG, przeciw transglutaminazie tkankowej (tTG) w klasie IgA metodą immunoenzymatyczną (ELISA), przeciw endomysium mięśni gładkich (EmA) w klasie IgA i IgG metodą immunofluorecencyjną. Ponadto oznaczono poziom TSH, fT4, fT3, poziom przeciwciał przeciw tyreoglobulinie (TG), przeciw peroksydazie tarczycowej (TPO) metodą ELISA na zestawach komercyjnych Hycor Biomedical, Inc. (San Diego, USA) i Orgentec Diagnostyka Germany) oraz wykonano USG tarczycy. Badania immunologiczne w kierunku diagnostyki choroby trzewnej i autoimmunologicznego zapalenia tarczycy wykonano w Zakładzie Immunopatologii Akademii Medycznej w Gdańsku. Kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. Jan Stępiński.

3.5. BADANIE AKTYWNOŚCI ENZYMU N-ACETYLO-B-D-GLUKOZAMINIDAZY I JEGO IZOENZYMU A I B

U wszystkich pacjentów i zdrowych dzieci dokonano oznaczenia poziomu aktywności w moczu i w surowicy krwi enzymu N-acetylo- β -D-glukozaminidazy (NAG) (Sigma-Aldrich, USA) i jego izoenzymu A i B. Aktywność enzymatyczną NAG w surowicy krwi i w moczu oznaczono metodą kolorymetryczną przez pomiar ilości uwolnionego p-nitrofenylo-2-acetamido-2-dezoksy- β -D-glukopiranozydu. Odczytu pomiaru dokonano przy pomocy spectrometru (Perkin Elmer MBA 2000, USA) przy długości fali 405 nm.

Aktywność izoenzymów A i B oznaczono wykorzystując termochwiejność izoenzymu A. Aktywność NAG całkowitego i jego izoenzymów A i B w surowicy krwi wyrażono w jednostkach IU/l, natomiast w moczu IU/g. kreatyniny.

Badanie aktywności enzymu N-acetylo- β -D-glukozaminidazy i jego izoenzymu A i B w surowicy krwi i w moczu wykonano w Zakładzie Immunologii, Katedrze Histologii i Immunologii Akademii Medycznej w Gdańsku (Kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Jolanta Myśliwska).

3.6. BADANIA POZIOMU CYTOKIN: TNF- α , IL-6, VEGF, IL-10, IL-12

3.6.1. Uzyskiwanie materiału biologicznego

W celu uzyskania surowicy od pacjentów jak i też zdrowej grupy kontrolnej krwi potrzebnej do analiz, pobrano od nich 2 ml krwi żyłnej do probówek nie zawierających antykoagulantu. Wszystkie pobrania były przy okazji innych badań biochemicznych. Pobraną krew wirowano przez 15 minut, przy prędkości 2500 obrotów/min (3K15, 4K15 Sigma, USA).

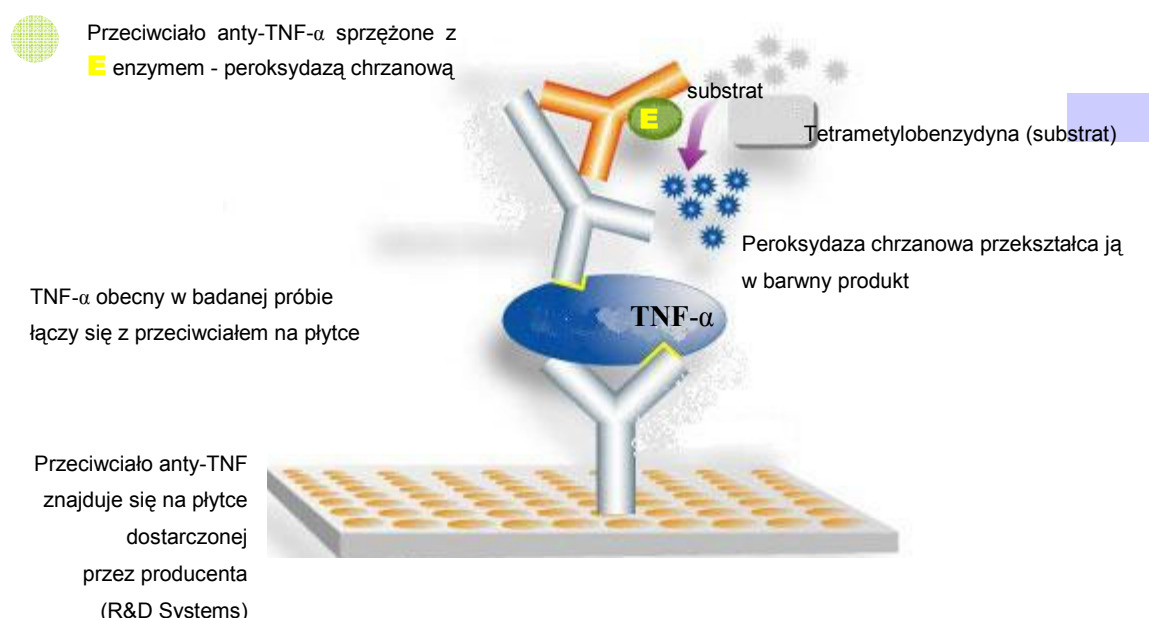
Tak uzyskaną surowicę, przenoszono w warunkach jałowych w (komorze z laminarnym, pionowym przepływem powietrza Hareus, USA) do sterylnych ependorfów w ilości około 500 μ l. Zabezpieczone surowice krwi dzieci z cukrzycą typu 1 oraz grupy kontrolnej, przechowywano do dalszej analizy w temperaturze -70 °C (zamrażarka POLAR 550H).

3.6.2. Testy immunoenzymatyczne ELISA: w surowicy TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12, VEGF oraz IL-6 w moczu

U wszystkich badanych dzieci oznaczono poziom czynnika martwicy nowotworu- α (TNF- α), interleukiny 6 (IL-6), naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonka (VEGF), interleukiny 10 (IL-10), interleukiny 12 (IL-12) w surowicy krwi oraz IL-6 w moczu metodą immunoenzymatyczną (ELISA).

Badania poziomu cytokin wykonano w Zakładzie Immunologii, Katedra Histologii i Immunologii Akademii Medycznej w Gdańsku (Kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Jolanta Myśliwska).

Testy immunoenzymatyczne ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) wykonane były oddzielenie dla każdej z cytokin TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12, VEGF w surowicy krwi oraz IL-6 w moczu przy użyciu komercyjnych zestawów firmy R&D Systems Minneapolis, USA według zaleceń producenta. Przykład zasady działania ilościowego wykrywania badanych cytokin przedstawiono na przykładzie TNF- α na ryc. 1.



Ryc. 1. Zasada metody ELISA (źródło: www.gbichina.com).

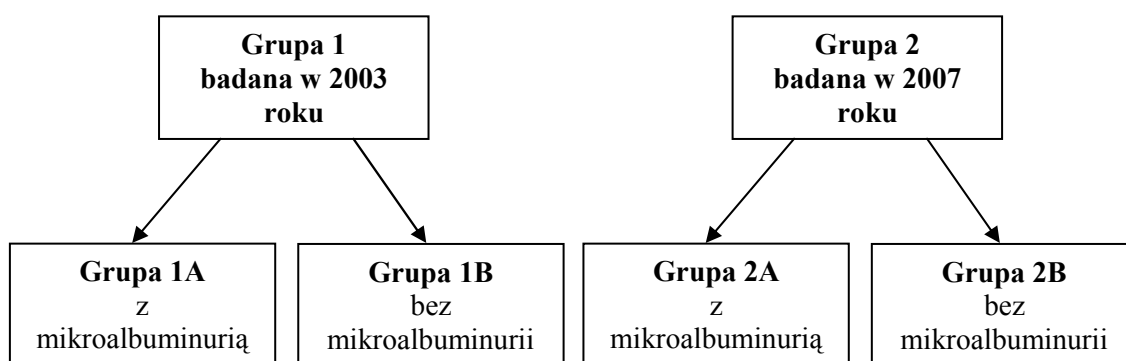
Fig. 1. Outline of the ELISA assai (fordetails please refer to: www.gbichina.com)

Procedura działania testów immunoenzymatycznych ELISA

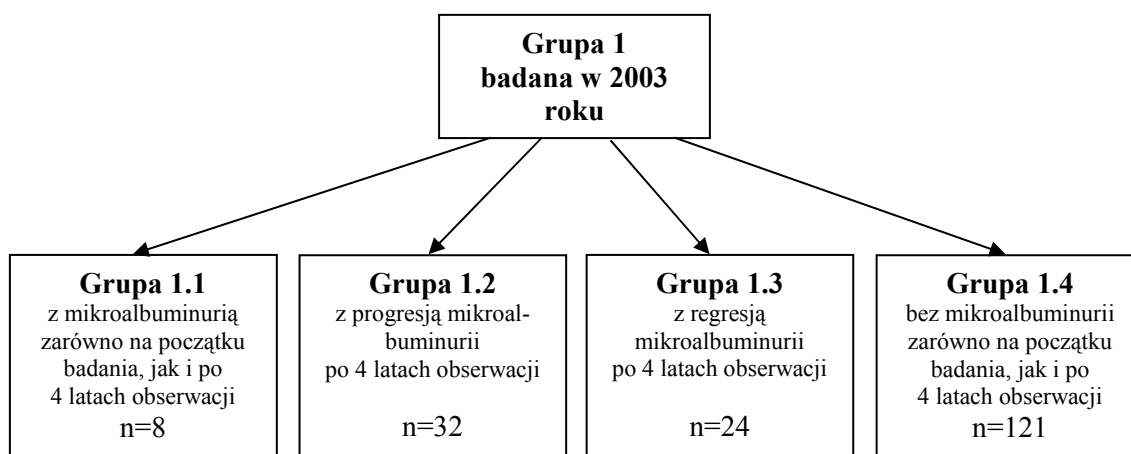
Każdy z zestawów zawierał 96-dołkową płytkę opłaszczoną przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko badanej cytokinie. Przed nałożeniem badanych próbek, do każdego z dołków dodawano po 100 μ l roztworu rozcieńczającego (Assai Diluent RD1W). Następnie na płytkę наносono po 200 μ l na dołek standardy dostarczone przez producenta jak też badane surowice dzieci z cukrzycą typu 1 oraz surowice dzieci zdrowych. Każdą surowicę badano w dwóch powtórzeniach. Tak przygotowaną płytkę inkubowano przez 2 godziny na wytrząsarce (700 ± 100 rpm) w temperaturze pokojowej. Następnie każdy dołek płukano trzykrotnie buforem (Wash Solution firmy R&D). Po czym dodawano po 200 μ l koniugatu przeciwciał skierowanych przeciwko badanej cytokinie, który sprzężony był z peroksydazą chrzanową. Po 2 godzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej, dołki ponownie przepłukiwano, a następnie do każdego z nich dodawano po 200 μ l substratu dla peroksydazy chrzanowej (TMB-tetrametylo-benzydyna). Po 30-minutowej inkubacji z wytrząsaniem i bez dostępu światła dodawano po 50 μ l kwasu siarkowego (Stop Solution) i mierzono absorbancję produktu barwnego reakcji enzymatycznej przy długości fali 450 nm na czytniku (Bio-Tek FL600, Bio-Tek Instruments, Inc. USA). Na podstawie absorbancji zmierzonej w dołkach standardowych tworzą krzywą standardową i według niej obliczano poziomy badanych cytokin w surowicach krwi. Minimalne wykrywalne stężenie wynoszą 0,12 pg/ml dla TNF- α i odpowiednio 0,03 pg/ml dla IL-6; 0,5 pg/ml dla IL-10; 1,0 pg/ml dla IL-12, 5 pg/ml dla VEGF.

3.7. USTALENIE KRYTERIÓW PODZIAŁU PACJENTÓW NA GRUPY

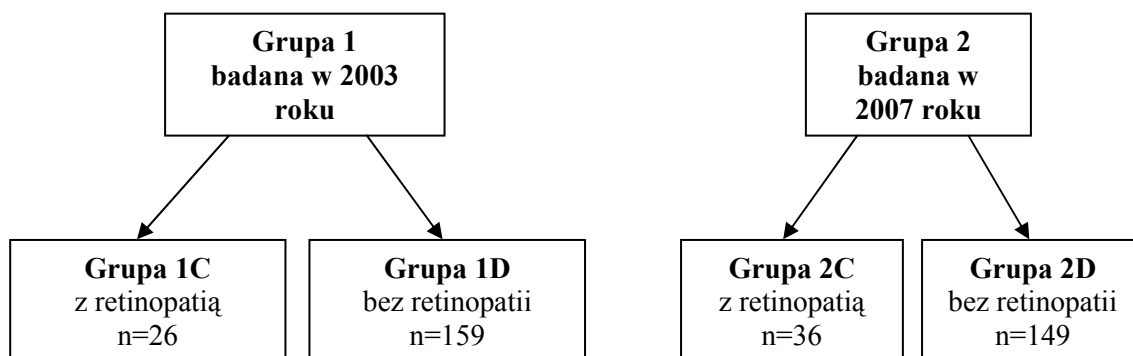
Na podstawie wielkości wydalania albumin w moczu dzieci z cukrzycą typu 1 zarówno na początku badania (grupa 1), jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2) podzielono na 2 grupy:



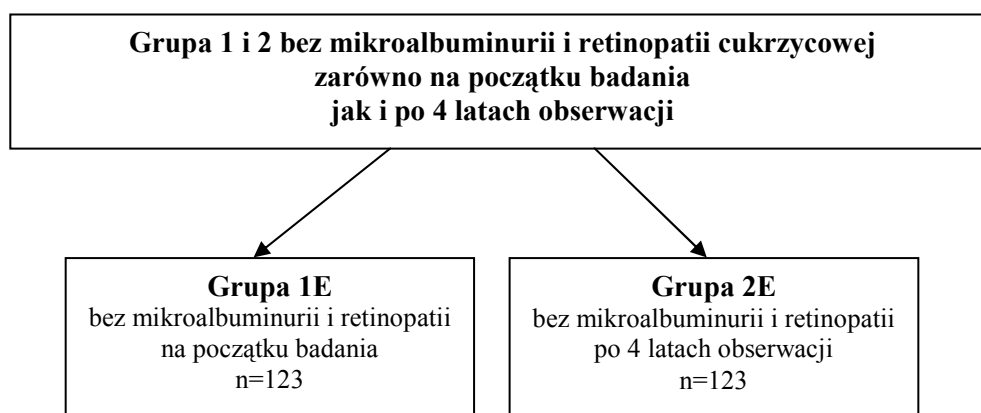
W dalszej części pracy dokonano podziału dzieci z cukrzycą typu 1 z grupy 1 na 4 podgrupy w zależności od: rozwoju mikroalbuminurii (progresja), ustąpienia mikroalbuminurii (regresja) po 4 latach obserwacji oraz od obecności lub nieobecności mikroalbuminurii zarówno na początku badania, jak i po 4 latach obserwacji



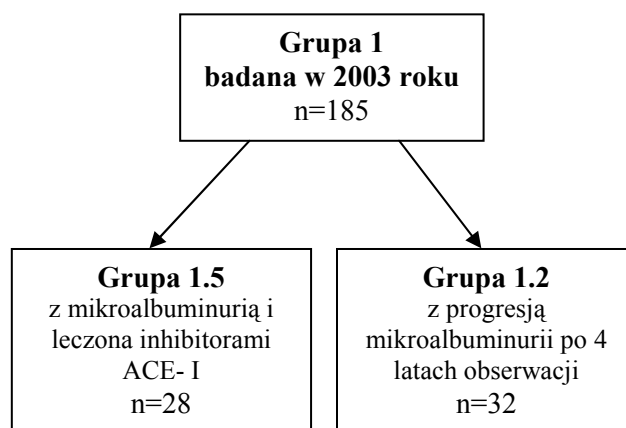
Na podstawie wyniku badania okulistycznego dzieci z cukrzycą typu 1 zarówno na początku badania (grupa 1), jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2) podzielono na 2 grupy:



W celu określenia wartości prognostycznych badanych parametrów biochemicznych i immunologicznych u dzieci z cukrzycy typu 1 zapowiadających w najbliższych latach przebieg choroby bez rozwoju nefropatii i retinopatii cukrzycowej, porównano grupę pacjentów, u których zarówno na początku badania, jak i po 4 latach obserwacji nie udokumentowano mikroalbuminurii, nadciśnienia tętniczego i zmian w narządzie wzroku.



W celu określenia efektu terapeutycznego inhibitorów ACE stosowanych u dzieci z cukrzycą typu 1 porównano parametry kliniczne, biochemiczne i immunologiczne, zarówno na początku badania jak i po 4 latach obserwacji, grupy pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku choroby i leczonych przez cały okres prowadzonych badań inhibitorami ACE (grupa 1.5) z grupą chorych z progresją choroby w kierunku mikroalbuminurii w trakcie 4-letniej obserwacji i nie leczonych inhibitorami ACE (grupa 1.2).



3.8. METODY STATYSTYCZNE

Każdą zmienną o charakterze ciągłym oceniano pod względem zgodności jej rozkładu z rozkładem normalnym (ocena histogramów, test Kołmogorowa-Smirnowa). Zmienne o rozkładzie zgodnym z rozkładem normalnym analizowano metodami parametrycznymi. Do oceny różnic pomiędzy takimi zmiennymi stosowano test t-Studenta oraz analizę wariancji (ANOVA) z testami *post-hoc* (założenia analizy wariancji weryfikowano standardowymi metodami). Do oceny zmienności parametrów w czasie stosowano test t-Studenta dla danych sparowanych lub ANOVA – układy z powtarzanymi pomiarami. Korelacje jednoczynnikowe oceniano metodą Pearsona. Zastosowano również analizę regresji wieloczynnikowej (dobór zmiennych metodą krokową postępującą) oraz regresję logistyczną. Modele statystyczne dla analiz wieloczynnikowych dobierano tak, aby wynikały z przesłanek merytorycznych oraz spełniały odpowiednie założenia (tj. odpowiednią do liczebności badanej grupy liczbę zmiennych, normalny rozkład zmiennych, brak współliniowości, normalny rozkład reszt).

Zmienne, których rozkład odbiegał od rozkładu normalnego analizowano metodami nieparametrycznymi. Dla porównania dwóch zmiennych o charakterze ciągłym stosowano test U Manna–Whitneya. Korelacje oceniano metodą Spearmanna. Związki pomiędzy zmiennymi skategoryzowanymi oceniano przy pomocy testu χ^2 .

W pracy przyjęto poziom istotności statystycznej $p < 0,05$. Obliczenia zostały przeprowadzone przy użyciu programu komputerowego „Statistica 7.1” firmy Stat-Soft licencjonowanego dla Akademii Medycznej w Gdańsku.

4. WYNIKI

4.1. PARAMETRY KLINICZNE, BIOCHEMICZNE I IMMUNOLOGICZNE U DZIECI Z CUKRZYCĄ TYPU 1 NA POCZĄTKU BADANIA I PO 4 LATACH OBSERWACJI

4.1.1. Charakterystyka kliniczna i biochemiczna dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2)

Analiza statystyczna wykazała, iż **dzieci z długotrwałą cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) charakteryzowały się statystycznie znamionym wyższym poziomem CRP ($p=0,001$), istotnie niższym dobowym wydalaniem albumin w moczu ($p=0,018$) (grupa 1) niż po 4 latach obserwacji (grupa 2)**. Nie wykazano natomiast znamienne statystycznych różnic między grupami w zakresie HbA1c, kreatyniny, ciśnienia skurczowego i rozkurczowego, parametrów gospodarki lipidowej oraz hormonów tarczycy i TSH (tab. 1).

Tab. 1. Parametry kliniczne i biochemiczne u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2).

Tab. 1. Clinical and biochemical parameters of the children with type 1 diabetes mellitus assessed at the time of beginning of the study (group 1) and after 4 years of clinical observation (group 2).

Parametry kliniczni i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 1 / Group 1 (n=185)	Grupa 2 / Group 1 (n=185)	p
Wiek (lata) / <i>Age (years)</i>	12,5 ± 3,9	16,4 ± 3,9	0,001
Płeć (K/M) / <i>Sex (F/M)</i>	95/90	95/90	–
Czas trwania choroby (lata) <i>Duration of diabetes (years)</i>	4,5 ± 3,1	8,4 ± 3,2	<0,001
Wiek zachorowania (lata) <i>The age at diagnosis (years)</i>	8,1 ± 3,6	8,1 ± 3,6	–
BMI (kg/m ²)	19,2 ± 3,3	20,5 ± 3,3	<0,001
C-peptyd / <i>C-peptide (ng/ml)</i>	< 0,5	< 0,5	–
Glukoza w surowicy <i>Serum glucose (mg/dl)</i>	151,7 ± 65,6*	139,1 ± 38,7	0,013
HbA1c (%)	8,3 ± 1,9	8,5 ± 1,8	0,126
CRP (mg/l)	1,53 ± 0,92*	1,24 ± 0,84	0,001

Parametry kliniczni i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 1 / Group 1 (n=185)	Grupa 2 / Group 1 (n=185)	p
Kreatynina / <i>Creatinine</i> (mg/dl)	0,75 ± 0,12	0,77 ± 0,11	0,118
Albuminuria (mg/dobę)	19,8 (0,2-244,0)*	23,7 (0,9-274,0)	0,018
Cystatyna C / <i>Cystatine C</i> (mg/l)	0,65 ± 0,21	0,70 ± 0,20	0,127
Cholesterol całkowity <i>Total cholesterol</i> (mmol/l)	168,8 ± 34,2	174,3 ± 32,7	0,089
Cholesterol LDL <i>LDL-cholesterol</i> (mmol/l)	87,2 ± 26,2	95,0 ± 30,6	0,214
Cholesterol HDL <i>HDL-cholesterol</i> (mmol/l)	6,1 ± 13,3	56,6 ± 13,1	0,098
Trójglicerydy <i>Triglycerides</i> (mmol/l)	81,8 ± 37,1	87,1 ± 43,0	0,028
Ciśnienie skurczowe <i>Systolic blood pressure</i> (mmHg)	113,0 ± 12,0	115,0 ± 12,0	0,051
Ciśnienie rozkurczowe <i>Diastolic blood pressure</i> (mmHg)	71,0 ± 9,0	73,0 ± 8,0	0,067
TSH (μU/ml)	1,9 ± 0,90	1,8 ± 1,5	0,433
FT4 (pmol/l)	14,1 ± 2,53	13,9 ± 2,4	0,369
FT3 (pmol/l)	4,8 ± 1,4	4,4 ± 1,1	0,445

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1 i grupą 2 ($p < 0,05$)

* *statistical significance between group 1 and group 2 ($p < 0.05$)*

4.1.2. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2)

Porównując wartości aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B w surowicy krwi i w moczu w obu badanych grupach wykazano statystycznie znamienne niższe wartości aktywności badanego enzymu NAG i jego izoenzymów A i B zarówno w surowicy krwi jak i w moczu ($p < 0,001$) w grupie dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) niż w tej samej grupie pacjentów, ale po 4 latach obserwacji (grupa 2) (tab. 2).

Tab. 2. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2).

Tab. 2. Activity of the NAG enzyme and its A and B isoforms in children with type 1 diabetes mellitus assessed at the time of beginning of the study (group 1) and after 4 years of clinical observation (group 2).

Parametry biochemiczne <i>Biochemical parameters</i>	Grupa 1 / Group 1 (n=185)	Grupa 2 / Group 2 (n=185)	p
NAG w surowicy <i>Serum NAG (U/l)</i>	30,5 ± 13,4*	34,3 ± 15,2	<0,001
NAG A w surowicy <i>Serum NAG A (U/l)</i>	23,8 ± 12,0*	26,2 ± 13,8	<0,001
NAG B w surowicy <i>Serum NAG B (U/l)</i>	6,7 ± 2,9*	8,2 ± 42,7	<0,001
NAG w moczu (U/g. kreat.) <i>Urine NAG (U/g. cr.)</i>	17,8 ± 9,4*	22,5 ± 12,4	<0,001
NAG A w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG A (U/g cr.)</i>	13,2 ± 7,3*	17,1 ± 11,5	<0,001
NAG B w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG B (U/g cr.)</i>	4,2 ± 2,1*	5,8 ± 3,4	<0,001

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1 i grupą 2 (p<0,05)

* statistical significance between group 1 and group 2 (p<0,05)

4.1.3. Parametry immunologiczne u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2)

Dzieci na początku badania (grupa 1) wykazywały statystycznie znamienne niższy poziom TNF- α (p<0,001), VEGF (p<0,001) oraz IL-10 (p<0,001) w surowicy krwi w porównaniu do wartości tych cytokin uzyskanych w tej samej grupie dzieci, ale po 4 latach obserwacji (grupa 2). Poziom IL-12 w surowicy krwi był niższy u pacjentów z grupy 1 niż u dzieci z grupy 2, ale różnica ta nie była istotna statystycznie (p=0,091) (tab. 3).

Tab. 3. Parametry immunologiczne u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2).

Tab. 3. Immunologic parameters of the children with type 1 diabetes mellitus assessed at the time of beginning of the study (group 1) and after 4 years of clinical observation (group 2).

Parametry immunologiczne <i>Immunologic parameters</i>	Grupa 1 / Group 1 (n=185)	Grupa 2 / Group 2 (n=185)	p
TNF- α w surowicy <i>Serum TNF-α (pg/ml)</i>	1,5 (0,00–10,4)*	2,7 (0,00–17,3)	<0,001
VEGF w surowicy <i>Serum VEGF (pg/ml)</i>	245,8 (13,5–1064,1)*	362,6 (19,3–1003,2)	<0,001
IL-12 w surowicy <i>Serum IL-12 (pg/ml)</i>	1,8 (0,00–18,8)	2,1 (0,00–13,2)	0,091
IL-10 w surowicy <i>Serum IL-10 (pg/ml)</i>	1,6 (0,00–14,8) *	2,4 (0,00–19,2)	<0,001

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1 i grupą 2 ($p < 0,05$)

* *statistical significance between group 1 and group 2 ($p < 0.05$)*

Podsumowując, grupa dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania charakteryzowała się statystycznie znamionym wyższym poziomem CRP, istotnie niższym dobowym wydalaniem albumin w moczu, istotnie niższymi wartościami aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B zarówno w surowicy krwi, jak i w moczu oraz statystycznie znamionym niższym poziomem TNF- α , VEGF oraz IL-10 w surowicy krwi w porównaniu do tej samej grupy pacjentów, ale po 4 latach obserwacji.

4.2. ANALIZA PORÓWNAWCZA PARAMETRÓW KLINICZNYCH, BIOCHEMICZNYCH I IMMUNOLOGICZNYCH U DZIECI Z CUKRZYCĄ TYPU 1 NA POCZĄTKU BADANIA ORAZ U DZIECI ZDROWYCH

4.2.1. Analiza porównawcza parametrów klinicznych i biochemicznych dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) z grupą dzieci zdrowych

Dzieci z przewlekłą cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) charakteryzowały się statystycznie znamionym wyższym poziomem HbA1c ($p=0,011$),

CRP ($p<0,001$), istotnie wyższym dobowym poziomem wydalania albumin w moczu ($p<0,001$), istotnie wyższym ciśnieniem skurczowym ($p=0,002$) i rozkurczowym ($p<0,001$) w porównaniu do grupy dzieci zdrowych. Natomiast nie wykazano różnic znamienne statystycznych pomiędzy grupami w zakresie cholesterolu całkowitego jego frakcji LDL- i HDL-cholesterolu, trójglicerydów, poziomu kreatyniny, cystatyny C oraz hormonów tarczycy i TSH (tab. 4).

Tab. 4. Parametry kliniczne i biochemiczne u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) oraz u dzieci zdrowych.

Tab. 4. Clinical and biochemical parameters of the children with type 1 diabetes mellitus at the time of beginning of the study (group 1) and healthy children.

Parametry kliniczne i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 1 <i>Group 1</i> (n=185)	Grupa kontrolna <i>Control group</i> (n=86)	p
Wiek (lata) / <i>Age (years)</i>	12,5 ± 3,9	13,4 ± 4,1	0,081
Płeć (K/M) / <i>Sex (F/M)</i>	95/90	52/34	0,161
Czas trwania choroby (lata) <i>Duration of diabetes (years)</i>	4,5 ± 3,1	—	—
Wiek zachorowania (lata) <i>The age at diagnosis (years)</i>	8,1 ± 3,6	—	—
BMI (kg/m ²)	19,2 ± 3,3*	17,3 ± 2,6	<0,001
C-peptyd/ C-peptide (ng/ml)	< 0,5	2,1 ± 0,4	-
Glukoza w surowicy <i>Serum glucose (mg/dl)</i>	151,7 ± 65,6*	88,8 ± 10,0	<0,001
HbA1c (%)	8,3 ± 1,9*	4,2 ± 0,34	0,011
CRP (mg/l)	1,53 ± 0,92*	0,5 ± 0,4	<0,001
Kreatynina / <i>Creatinine (mg/dl)</i>	0,75 ± 0,12	0,7 ± 0,2	0,081
Albuminuria (mg/dobę)	19,8 (0,2-244,0)*	3,07 (0,2 – 12,5)	<0,001
Cystatyna C / <i>Cystatine C (mg/l)</i>	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,263
Cholesterol całkowity <i>Total cholesterol (mmol/l)</i>	168,8 ± 34,2	157,6 ± 21,1	0,087

Parametry kliniczne i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 1 <i>Group 1</i> (n=185)	Grupa kontrolna <i>Control group</i> (n=86)	p
Cholesterol LDL <i>LDL-cholesterol</i> (mmol/l)	87,2 ± 26,2	71,3 ± 19,8	0,059
Cholesterol HDL <i>HDL-cholesterol</i> (mmol/l)	61,1 ± 13,3	57,5 ± 9,7	0,123
Trójglicerydy <i>Triglycerides</i> (mmol/l)	81,8 ± 37,1	80,3 ± 39,2	0,233
Ciśnienie skurczowe <i>Systolic blood pressure</i> (mmHg)	113,0 ± 12,0*	107,0 ± 8,0	0,002
Ciśnienie rozkurczowe <i>Diastolic blood pressure</i> (mmHg)	71,0 ± 9,0*	62,0 ± 6,0	<0,001
TSH (μU/ml)	1,9 ± 0,90	1,5 ± 1,5	0,433
FT4 (pmol/l)	14,1 ± 2,53	14,7 ± 2,5	0,357
FT3 (pmol/l)	4,8 ± 1,4	4,1 ± 1,3	0,458

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1 i grupą kontrolną ($p < 0,05$)

* *statistical significance between group 1 and healthy group ($p < 0.05$)*

4.2.2. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) oraz u dzieci zdrowych

Aktywność enzymu NAG ($p < 0,001$) i jego izoenzymów A ($p < 0,001$) i B ($p < 0,001$) w surowicy krwi oraz enzymu NAG ($p < 0,001$) i jego izoenzymów A ($p < 0,001$) i B ($p < 0,001$) w moczu u dzieci z cukrzycą typu 1 (grupa 1) była statystycznie znacząco wyższa w porównaniu do grupy dzieci zdrowych (tab. 5).

Tab. 5. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) oraz u dzieci zdrowych.

Tab. 5. Activity of the NAG enzyme and its A and B isoforms in children with type 1 diabetes mellitus at the time of beginning of the study (group 1) and healthy children.

Parametry biochemiczne <i>Biochemical parameters</i>	Grupa 1 <i>Group 1</i> (n=185)	Grupa kontrolna <i>Control group</i> (n=86)	p
NAG w surowicy <i>Serum NAG (U/l)</i>	30,5 ± 13,4*	14,64 ± 4,33	<0,001
NAG A w surowicy <i>Serum NAG A (U/l)</i>	23,8 ± 12,0*	11,00 ± 4,08	<0,001
NAG B w surowicy <i>Serum NAG B (U/l)</i>	6,7 ± 2,9*	3,51 ± 1,47	<0,001
NAG w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG (U/g cr.)</i>	17,8 ± 9,4*	6,5 ± 2,0	<0,001
NAG A w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG A (U/g cr.)</i>	13,2 ± 7,3*	4,1 ± 1,5	<0,001
NAG B w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG B (U/g cr.)</i>	4,2 ± 2,1*	2,3 ± 0,9	<0,001

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1 i grupą kontrolną ($p < 0,05$)

* *statistical significance between group 1 and healthy group ($p < 0.05$)*

4.2.3. Analiza porównawcza parametrów immunologicznych dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) z grupą dzieci zdrowych

Dzieci z cukrzycą typu 1 (grupa 1) w porównaniu z dziećmi zdrowymi wykazywały statystycznie znacząco wyższe wartości poziomu TNF- α ($p < 0,001$), VEGF ($p < 0,001$), IL-6 ($p < 0,001$), IL-12 ($p < 0,001$), IL-10 ($p < 0,001$), VEGF ($p < 0,001$) w surowicy krwi oraz IL-6 ($p < 0,001$) w moczu (tab. 6).

Tab. 6. Parametry immunologiczne u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) oraz u dzieci zdrowych.

Tab. 6. Immunologic parameters of the children diagnosed with type 1 diabetes mellitus at the time of beginning of the study (group 1) and healthy children.

Parametry immunologiczne <i>Immunologic parameters</i>	Grupa 1 <i>Group 1</i> (n=185)	Grupa kontrolna <i>Control group</i> (n=86)	p
TNF- α w surowicy <i>Serum TNF-α (pg/ml)</i>	1,5 (0,00 – 10,4)*	0,00 (0,00 – 0,00)	<0,001
VEGF w surowicy <i>Serum VEGF (pg/ml)</i>	245,8 (13,5–1064,1)*	60,0 (12,9–324,0)	<0,001
IL-6 w surowicy <i>Serum IL-6 (pg/ml)</i>	1,41 (0,00 – 6,25)*	0,27 (0,00 – 1,2)	<0,001
IL-6 w moczu (pg/g kreat.) <i>Urine IL-6 (pg/g cr.)</i>	1,63 (0,00 – 7,36)*	0,22 (0,00 – 1,19)	<0,001
IL-12 w surowicy <i>Serum IL-12 (pg/ml)</i>	1,8 (0,00 – 18,8)*	0,2 (0,00 – 2,5)	<0,001
IL-10 w surowicy <i>Serum IL-10 (pg/ml)</i>	1,6 (0,00 – 14,8)*	0,1 (0,00 – 1,0)	<0,001

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1 i grupą kontrolną ($p < 0,05$)

* *statistical significance between group 1 and healthy group ($p < 0.05$)*

Podsumowując, u dzieci z cukrzycą typu 1 stwierdzono statystycznie znamienne wyższy poziom HbA1c, istotnie wyższe ciśnienie skurczowe i rozkurczowe, wyższe wartości dobowego wydalania albumin w moczu oraz istotnie wyższą aktywność enzymu NAG i jego izoenzymów A i B w surowicy krwi i w moczu, a także istotnie wyższy poziom cytokin: TNF- α , VEGF, IL-12, IL-10 w surowicy krwi oraz IL-6 w surowicy krwi i w moczu w odniesieniu do grupy dzieci zdrowych.

4.3. ANALIZA PORÓWNAWCZA PARAMETRÓW KLINICZNYCH, BIOCHEMICZNYCH I IMMUNOLOGICZNYCH U DZIECI Z CUKRZYCĄ TYPU 1 Z UWZGLĘDNIENIEM POZIOMU HbA1c

4.3.1. Parametry kliniczne i biochemiczne u pacjentów na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2) z uwzględnieniem poziomu HbA1c

Analiza statystyczna badanych parametrów klinicznych i biochemicznych przeprowadzona metodą anova w grupie 1 i 2 uwzględniająca poziom HbA1c wykazała, iż wraz ze wzrostem czasu trwania choroby ($p^1=0,049$, $p^2=0,035$), wieku pacjenta ($p^1=0,034$, $p^2=0,001$), BMI ($p^1=0,001$, $p^2=0,008$) wzrastał poziom niewyrównania metabolicznego choroby u dzieci chorych na cukrzycę typu 1. Ponadto **stwierdzono statystycznie znamienne wzrost poziomu CRP ($p^1=0,013$, $p^2<0,001$), cystatyny C ($p^1=0,043$, $p^2=0,003$), cholesterolu całkowitego ($p^1<0,001$, $p^2<0,001$), jego frakcji LDL ($p^1<0,001$, $p^2=0,001$), poziomu trójglicerydów ($p^1<0,001$, $p^2<0,001$), wielkości ciśnienia skurczowego ($p^1=0,015$, $p^2=0,049$) i rozkurczowego ($p^1=0,024$, $p^2=0,006$) oraz poziomu wydalania albumin w moczu ($p^1=0,001$, $p^2<0,001$) wraz ze wzrostem poziomu HbA1c.** Natomiast nie wykazano istotnego związku pomiędzy poziomem HbA1c a płcią badanych pacjentów, wiekiem zachorowania na cukrzycę typu 1, poziomem HDL cholesterolu oraz kreatyniny w surowicy krwi w grupie 1 i 2 (tab. 7).

Tab. 7. Parametry kliniczne i biochemiczne u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania i po 4 latach obserwacji z uwzględnieniem poziomu HbA1c.

Tab. 7. Clinical and biochemical parameters of the children with type 1 diabetes mellitus assessed at the time of beginning of the study (group 1) and after 4 years of clinical observation (group 2) with regard to HbA1c level.

Grupa / <i>Group</i>	*HbA1c (< 7,5)	**HbA1c (7,5-9,9)	***HbA1c (≥10)	P (ANOVA)
Poziom / <i>Value</i> HbA1c				
Grupa 1 / <i>Group 1</i>	6,73 ± 0,58	8,50 ± 0,62	11,57 ± 1,62	—
Grupa 2 / <i>Group 2</i>	6,88 ± 0,40	8,36 ± 0,65	11,61 ± 1,34	
Wiek (lata) / <i>Age (years)</i>				
Grupa 1 / <i>Group 1</i>	11,59 ± 4,02	12,77 ± 3,66	13,63 ± 3,64	0,034
Grupa 2 / <i>Group 2</i>	15,19 ± 3,82	18,23 ± 2,74	16,61 ± 4,00	0,001

Grupa / Group	*HbA1c (<7,5)	**HbA1c (7,5-9,9)	***HbA1c (≥10)	P (ANOVA)
Płeć (K/M) / Sex (F/M)				
Grupa 1 / Group 1	36/35	44/40	15/15	0,996
Grupa 2 / Group 2	26/36	51/37	18/17	0,154
Czas trwania choroby (lata) / Duration of diabetes (years)				
Grupa 1 / Group 1	3,98 ± 2,64	4,6 ± 3,17	5,57 ± 3,87	0,049
Grupa 2 / Group 2	7,60 ± 2,44	9,17 ± 3,54	8,73 ± 3,36	0,035
Wiek zachorowania (lata) / The age at diagnosis (years)				
Grupa 1 / Group 1	7,79 ± 3,76	8,29 ± 3,45	8,10 ± 3,85	0,808
Grupa 2 / Group 2	7,74 ± 3,76	9,11 ± 3,43	7,92 ± 3,55	0,146
BMI (kg/m ²)				
Grupa 1 / Group 1	18,33 ± 2,87	19,20 ± 3,08	21,02 ± 4,13	0,001
Grupa 2 / Group 2	19,57 ± 2,96	21,71 ± 2,92	20,57 ± 3,40	0,008
Glukoza w surowicy / Serum glucose (mg/dl)				
Grupa 1 / Group 1	141,46 ± 51,63	149,70 ± 44,58	181,41 ± 118,34	0,018
Grupa 2 / Group 2	133,13 ± 31,25	153,29 ± 52,32	137,61 ± 36,03	0,057
CRP (mg/l)				
Grupa 1 / Group 1	1,32 ± 0,77	1,54 ± 1,00	1,97 ± 1,60	0,013
Grupa 2 / Group 2	1,25 ± 1,15	2,86 ± 1,59	2,10 ± 1,67	0,000
Kreatynina / Creatinine (mg/dl)				
Grupa 1 / Group 1	0,74 ± 0,11	0,75 ± 0,14	0,77 ± 0,12	0,519
Grupa 2 / Group 2	0,75 ± 0,11	0,79 ± 0,11	0,78 ± 0,12	0,078
Albuminuria (mg/dobę)				
Grupa 1 / Group 1	18,08 (0,2 – 241,0)	17,91 (0,7 – 244,0)	29,42 (1,7 – 120,0)	0,001
Grupa 2 / Group 2	12,43 (0,9 – 50,4)	49,76 (2,9 – 274,0)	21,24 (1,3 – 91,0)	<0,001
Cystatyna C / Cystatine C (mg/l)				
Grupa 1 / Group 1	0,62 ± 0,20	0,64 ± 0,22	0,74 ± 0,22	0,043
Grupa 2 / Group 2	0,64 ± 0,17	0,71 ± 0,20	0,78 ± 0,20	0,003
Cholesterol całkowity / Total cholesterol (mmol/l)				
Grupa 1 / Group 1	155,37 ± 28,54	173,85 ± 29,62	186,77 ± 45,58	<0,001
Grupa 2 / Group 2	162,46 ± 23,96	194,14 ± 36,14	174,65 ± 33,03	<0,001
Cholesterol LDL / LDL-cholesterol (mmol/l)				
Grupa 1 / Group 1	77,97 ± 21,29	90,99 ± 27,66	98,67 ± 26,01	<0,001
Grupa 2 / Group 2	91,23 ± 27,19	113,36 ± 31,79	90,57 ± 30,17	0,001
Cholesterol HDL / HDL-cholesterol (mmol/l)				
Grupa 1 / Group 1	60,27 ± 12,42	62,77 ± 14,11	58,33 ± 12,58	0,184
Grupa 2 / Group 2	57,25 ± 12,64	53,82 ± 11,36	57,29 ± 14,00	0,460

Grupa / Group	*HbA1c (<7,5)	**HbA1c (7,5-9,9)	***HbA1c (≥10)	P (ANOVA)
Trójglicerydy / <i>Triglycerides</i> (mmol/l)				
Grupa 1 / <i>Group 1</i>	67,38 ± 27,91	83,15 ± 35,57	112,09 ± 42,24	<0,001
Grupa 2 / <i>Group 2</i>	74,66 ± 32,51	122,51 ± 55,45	81,33 ± 35,94	<0,001
Ciśnienie skurczowe / <i>Systolic blood pressure</i> (mmHg)				
Grupa 1 / <i>Group 1</i>	110,0 ± 11,0	114,0 ± 11,0	117,0 ± 15,0	0,015
Grupa 2 / <i>Group 2</i>	113,0 ± 11,0	119,0 ± 10,0	114,0 ± 14,0	0,049
Ciśnienie rozkurczowe / <i>Diastolic blood pressure</i> (mmHg)				
Grupa 1 / <i>Group 1</i>	69,0 ± 9,0	72,0 ± 8,0	75,0 ± 10,0	0,024
Grupa 2 / <i>Group 2</i>	71,0 ± 7,0	76,0 ± 8,0	73,0 ± 7,0	0,006

* Grupa 1 / *Group 1* (n=71), Grupa 2 / *Group 2* (n=72)

** Grupa 1 / *Group 1* (n=84), Grupa 2 / *Group 2* (n=88)

*** Grupa 1 / *Group 1* (n=30), Grupa 2 / *Group 2* (n=35)

4.3.2. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B u pacjentów na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2) z uwzględnieniem poziomu HbA1c

Analiza statystyczna poziomu aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B w surowicy krwi i w moczu przeprowadzona metodą anova w grupie 1 i 2 uwzględniająca poziom HbA1c wykazała statystycznie znamienny wzrost poziomu enzymu NAG ($p^2 < 0,027$) i jego izoenzymu A ($p^2 = 0,039$) i B ($p^2 = 0,043$) w moczu wraz ze wzrostem poziomu HbA1c tylko w grupie 2. Natomiast poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymu A i B w surowicy krwi i w moczu w grupie 1 również wzrastał wraz ze wzrostem poziomu niewyrównania metabolicznego choroby, ale wzrost aktywności badanego enzymu nie był istotny statystycznie (tab. 8).

Tab. 8. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2) z uwzględnieniem poziomu HbA1c

Tab. 8. Activity of the NAG enzyme and its A and B isoforms in children with type 1 diabetes mellitus assessed at the time of beginning of the study (group 1) and after 4 years of clinical observation (group 2) with regard to HbA1c level.

Grupa / Group	*HbA1c (< 7,5)	**HbA1c (7,5-9,9)	***HbA1c (≥10)	P (ANOVA)
NAG w surowicy / Serum NAG (U/l)				
Grupa 1 / Group 1	29,49 ± 11,85	29,38 ± 14,15	36,16 ± 14,01	0,143
Grupa 2 / Group 2	30,6 ± 12,74	37,27 ± 14,79	35,67 ± 16,52	0,650
NAG A w surowicy / Serum NAG A (U/l)				
Grupa 1 / Group 1	22,45 ± 12,4	23,17 ± 12,57	29,11 ± 13,47	0,316
Grupa 2 / Group 2	22,8 ± 11,33	28,5 ± 13,66	27,6 ± 15,16	0,677
NAG B w surowicy / Serum NAG B (U/l)				
Grupa 1 / Group 1	6,89 ± 3,1	6,2 ± 2,68	7,62 ± 2,75	0,115
Grupa 2 / Group 2	7,84 ± 2,51	8,85 ± 2,42	8,1 ± 2,82	0,648
NAG w moczu (U/g. kreat.) / Urine NAG (U/g.cr.)				
Grupa 1 / Group 1	16,35 ± 8,46	17,21 ± 7,95	22,87 ± 13,14	0,076
Grupa 2 / Group 2	17,17 ± 9,97	30,22 ± 12,19	23,02 ± 12,27	0,027
NAG A w moczu (U/g. kreat.) / Urine NAG A (U/g.cr.)				
Grupa 1 / Group 1	12,23 ± 6,81	12,92 ± 6,83	16,27 ± 9,08	0,164
Grupa 2 / Group 2	12,65 ± 7,9	24,41 ± 16,6	17,2 ± 9,55	0,039
NAG B w moczu (U/g. kreat.) / Urine NAG B (U/g.cr.)				
Grupa 1 / Group 1	4,02 ± 1,86	4,06 ± 1,86	4,87 ± 3,16	0,105
Grupa 2 / Group 2	4,59 ± 2,98	7,84 ± 3,23	5,83 ± 3,38	0,043

* Grupa 1 / Group 1 (n=71), Grupa 2 / Group 2 (n=72)

** Grupa 1 / Group 1 (n=84), Grupa 2 / Group 2 (n=88)

*** Grupa 1 / Group 1 (n=30), Grupa 2 / Group 2 (n=35)

4.3.3. Parametry immunologiczne u pacjentów na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2) z uwzględnieniem poziomu HbA1c

Analiza statystyczna poziomu badanych cytokin przeprowadzona metodą anova w grupie 1 i 2 uwzględniająca poziom HbA1c wykazała statystycznie znamienny wzrost poziomu TNF-α ($p^1=0,005$, $p^2<0,027$) i VEGF ($p^1=0,045$, $p^2<0,001$) w surowicy krwi w grupie 1 i 2 oraz IL-6 ($p^1=0,004$) w moczu w grupie 1 wraz ze wzrostem poziomu

HbA1c. Natomiast poziom IL-6 w surowicy krwi wzrastał wraz z pogorszeniem stopnia wyrównania metabolicznego, ale wzrost jego poziomu nie był istotny statystycznie. Ponadto analiza statystyczna wykazała istotny spadek poziomu IL-10 w grupie 2, szczególnie u pacjentów z poziomem HbA1c powyżej 10% (tab. 9).

Tab. 9. Parametry immunologiczne u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2) z uwzględnieniem poziomu HbA1c.

Tab. 9. Immunologic parameters in children with type 1 diabetes mellitus assessed at the time of beginning of the study (group 1) and after 4 years of clinical observation (group 2) with regard to HbA1c level.

Grupa / Group	*HbA1c (< 7,5)	**HbA1c (7,5–9,9)	***HbA1c (≥10)	P (ANOVA)
TNF-α w surowicy / Serum TNF-α (pg/ml)				
Grupa 1 / Group 1	1,16 (0,00 – 5,35)	1,35 (0,00 – 6,3)	2,75 (0,00 – 10,4)	0,005
Grupa 2 / Group 2	1,35 (0,00 – 7,61)	4,22 (0,00 – 13,6)	29,6 (0,0 – 17,34)	0,027
VEGF w surowicy / Serum VEGF (pg/ml)				
Grupa 1 / Group 1	218,7 (13,45 – 803,0)	239,3 (23,79 – 1064,1)	328,12 (23,7 – 926,47)	0,045
Grupa 2 / Group 2	244,9 (55,34 – 857,3)	590,9 (101,34 – 983,53)	353,4 (19,34 – 1003,24)	<0,001
IL-6 w surowicy / Serum IL-6 (pg/ml)				
Grupa 1 / Group 1	1,3 (0,00 – 5,36)	1,41 (0,00 – 5,6)	1,68 (0,00 – 6,25)	0,089
IL-6 w moczu / Urine IL-6 (pg/ml)				
Grupa 1 / Group 1	1,45 (0,10 – 5,77)	1,52 (0,00 – 7,36)	2,39 (0,00 – 5,88)	0,004
IL-12 w surowicy / Serum IL-12 (pg/ml)				
Grupa 1 / Group 1	1,72 (0,00 – 7,6)	1,8 (0,00 – 18,8)	2,13 (0,00 – 7,3)	0,571
Grupa 2 / Group 2	2,47 (0,00 – 12,6)	1,44 (0,00 – 8,83)	2,16 (0,00 – 13,2)	0,581
IL-10 w surowicy / Serum IL-10 (pg/ml)				
Grupa 1 / Group 1	1,73 (0,00 – 13,4)	1,84 (0,00 – 14,8)	0,87 (0,00 – 7,3)	0,176
Grupa 2 / Group 2	3,5 (0,00 – 19,2)	2,28 (0,00 – 15,0)	0,57 (0,00 – 4,3)	0,001

* Grupa 1 / Group 1 (n=71), Grupa 2 / Group 2 (n=72)

** Grupa 1 / Group 1 (n=84), Grupa 2 / Group 2 (n=88)

*** Grupa 1 / Group 1 (n=30), Grupa 2 / Group 2 (n=35)

4.4. ANALIZA KORELACJI HbA1c Z PARAMETRAMI KLINICZNYMI, BIOCHEMICZNYMI I IMMUNOLOGICZNYMI U DZIECI Z CUKRZYCĄ TYPU 1

4.4.1. Analiza korelacji HbA1c z parametrami klinicznymi i biochemicznymi u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2)

W grupie dzieci z cukrzycą typu 1 zarówno na początku badania (grupa 1) jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2) **stwierdzono dodatnią statystycznie zmienną korelację pomiędzy poziomem HbA1c z wiekiem pacjenta** ($R=0,2$, $p^1=0,008$; $R=0,32$, $p^2<0,001$), czasem trwania choroby ($R=0,20$, $p^1=0,006$; $R=0,22$, $p^2=0,002$), poziomem CRP ($R=0,15$, $p^1=0,043$; $R=0,043$, $p^2<0,001$), BMI ($R=0,24$, $p^1=0,001$; $R=0,26$, $p^2<0,001$), **poziomem cystatyny C** ($R=0,19$, $p^1=0,001$; $R=0,33$, $p^2<0,001$), **wielkością wydalania albumin w moczu** ($R=0,18$, $p^1=0,013$; $R=0,45$, $p^2<0,001$) oraz **wielkością ciśnienia skurczowego** ($R=0,23$, $p^1=0,001$; $R=0,24$, $p^2=0,001$) (tab. 10).

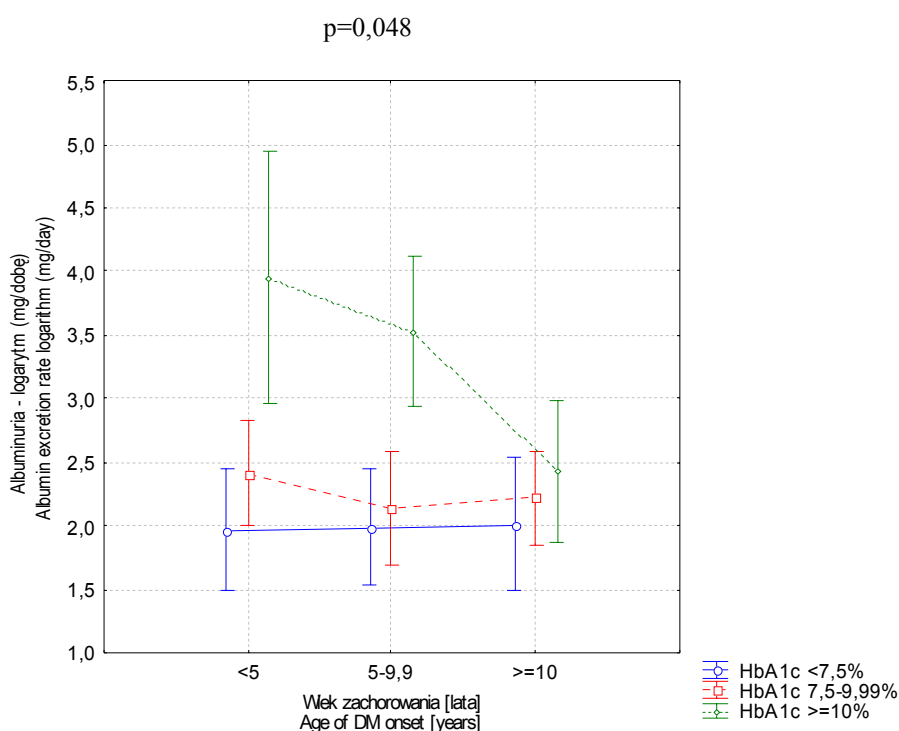
Tab. 10. Wyniki badań korelacyjnych HbA1c z parametrami klinicznymi i biochemicznymi w grupie 1 i w grupie 2.

Tab. 10. The results of the correlation analysis between HbA1c and clinical and biochemical parameters evaluated for the group 1 and the group 2.

HbA1c (%) Grupa / Group	Wiek (lata) Age (years)	Czas trwania choroby (lata) Duration of diabetes (years)	CRP (mg/l)	Albuminuria (mg/24 h)	Cystatyna C Cystatine C (mg/l)
Grupa 1 Group 1	$R = 0,2$ $p = 0,008$	$R = 0,2$ $p = 0,006$	$R = 0,15$ $p = 0,043$	$R = 0,18$ $p = 0,013$	$R = 0,19$ $p = 0,010$
Grupa 2 Group 2	$R = 0,32$ $p < 0,001$	$R = 0,22$ $p = 0,002$	$R = 0,43$ $p < 0,001$	$R = 0,45$ $p < 0,001$	$R = 0,33$ $p < 0,001$

4.4.2. Analiza zależności pomiędzy poziomem HbA1c, wiekiem zachorowania na cukrzycę typu 1 a wielkością wydalania albumin w moczu

W grupie dzieci z cukrzycą typu 1 oraz z poziomem HbA1c poniżej 10% nie wykazano istotnych zależności pomiędzy poziomem wydalania albumin w moczu a wiekiem zachorowania na cukrzycę. Natomiast **poziom HbA1c powyżej 10% istotnie zwiększał ryzyko rozwoju nefropatii cukrzycowej wraz z niższym wiekiem zachorowania na cukrzycę typu 1** ($p=0,048$) (ryc. 2).



Ryc. 2. Zależność pomiędzy poziomem HbA1c, wiekiem zachorowania na cukrzycę typu 1 a wielkością wydalania albumin w moczu

Fig. 2. Correlation between HbA1c level, the age at diagnosis with diabetes mellitus type 1 and the rate of urine albumin secretion.

4.4.3. Analiza korelacji HbA1c z enzymem NAG i jego izoenzymami A i B w surowicy i w moczu u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2)

U dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) nie stwierdzono istotnych statystycznie znamiennych korelacji pomiędzy poziomem HbA1c a aktywnością

enzymu NAG całkowitego i jego izoenzymów zarówno w surowicy krwi jak i w moczu. Natomiast **po 4 latach obserwacji (grupa 2) wykazano istotne korelacje pomiędzy HbA1c a aktywnością enzymu NAG ($R=0,23$; $p^2=0,002$) i jego izoenzymu A ($R=0,22$; $p^2=0,003$) w surowicy krwi oraz enzymu NAG ($R=0,42$; $p^2<0,001$), jego izoenzymu A ($R=0,43$; $p^2<0,001$) i B ($R=0,39$; $p^2<0,001$) w moczu (tab. 11).**

Tab. 11. Wyniki badań korelacyjnych HbA1c z enzymem NAG i jego izoenzymami A i B w surowicy i w moczu w grupie 1 i w grupie 2.

Tab. 11. The results of the correlation analysis between HbA1c and serum and urine activity of the NAG enzyme and its A and B isoforms evaluated for the group 1 and the group 2.

HbA1c (%) Grupa / Group	NAG surowica serum (U/l)	NAG A surowica serum (U/l)	NAG mocz / urine (U/g kreat.)	NAG A mocz / urine (U/g kreat.)	NAG B mocz / urine (U/g kreat.)
Grupa 1 Group 1	$R = 0,11$ $p = 0,154$	$R = 0,11$ $p = 0,139$	$R = 0,16$ $p = 0,096$	$R = 0,12$ $p = 0,105$	$R = 0,08$ $p = 0,287$
Grupa 2 Group 2	$R = 0,23$ $p = 0,002$	$R = 0,22$ $p = 0,003$	$R = 0,42$ $p < 0,001$	$R = 0,43$ $p < 0,001$	$R = 0,39$ $p < 0,001$

4.4.4. Analiza korelacji HbA1c z parametrami immunologicznymi u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2)

U dzieci z cukrzycą typu 1 zarówno na początku badania (grupa 1) jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2) **stwierdzono dodatnią statystycznie zmienną korelację pomiędzy poziomem HbA1c a poziomem TNF- α ($R=0,19$, $p^1=0,009$; $R=0,37$, $p^2<0,001$) oraz poziomem VEGF ($R=-0,20$, $p^1=0,007$; $R=0,48$, $p^2<0,001$) w surowicy krwi.** (tab. 12).

Tab. 12. Wyniki badań korelacyjnych HbA1c z parametrami immunologicznymi w grupie 1 i w grupie 2.

Tab. 12. The results of the correlation analysis between HbA1c and immunologic parameters characterizing patients of the group 1 and the group 2 respectively.

HbA1c (%) Grupa / Group	TNF-α (pg/ml) surowica / serum	VEGF (pg/ml) surowica / serum	IL-12 (pg/ml) surowica / serum
Grupa 1 <i>Group 1</i>	R = 0,19 p = 0,009	R = 0,20 p = 0,007	R = -0,02 p = 0,789
Grupa 2 <i>Group 2</i>	R = 0,37 p < 0,001	R = 0,48 p < 0,001	R = -0,19 p = 0,008

4.5. CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA, BIOCHEMICZNA I IMMUNOLOGICZNA PACJENTÓW NA POCZĄTKU CHOROBY, Z UWZGLĘDNIENIEM ROZWOJU MIKROALBUMINURII

Na początku badania wykazano u 32 (17,3%) pacjentów mikroalbuminurię spośród 185 badanych dzieci z cukrzycą typu 1. W grupie pacjentów z mikroalbuminurią dodatkowo stwierdzono u 15 dzieci z cukrzycą typu 1 retinopatię cukrzycową, u 3 pacjentów jednocześnie retinopatię cukrzycową i nadciśnienie tętnicze. W grupie pacjentów bez udokumentowanej mikroalbuminurii (n=153) u 7 dzieci wykryto retinopatię cukrzycową, a u 1 pacjenta obok retinopatii cukrzycowej również nadciśnienie tętnicze (tab. 13).

Tab. 13. Współistniejące powikłania w grupie pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią i bez mikroalbuminurii na początku badania.

Tab. 13. The list of coexistent complications in diabetic patients presenting with documented microalbuminuria and those without signs of microalbuminuria at the beginning of the study.

Pacjenci z mikroalbuminurią <i>Patients with microalbuminuria</i> Grupa 1A / Group 1A (n = 32)	Pacjenci bez mikroalbuminurii <i>Patients without microalbuminuria</i> Grupa 1B / Group 1B (n = 153)
15 retinopatia cukrzycowa <i>15 diabetic retinopathy</i>	7 retinopatia cukrzycowa <i>7 diabetic retinopathy</i>
3 współistnienie retinopatii cukrzycowej z nadciśnieniem tętniczym <i>3 diabetic retinopathy and hypertension</i>	17 współistnienie retinopatii cukrzycowej z nadciśnieniem tętniczym <i>17 diabetic retinopathy and hypertension</i>

4.5.1. Parametry kliniczne i biochemiczne na początku badania u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 1A) oraz u pacjentów bez mikroalbuminurii (grupa 1B)

Na podstawie wielkości wydalania albumin w moczu pacjentów z cukrzycą typu 1 na początku badania podzielono na 2 grupy. Grupę dzieci z cukrzycą typu 1, u których udokumentowano mikroalbuminurię (grupa 1A) oraz grupę pacjentów, u których nie stwierdzono zwiększonego wydalania albumin w moczu (grupa 1B). Dane kliniczne i biochemiczne poszczególnych grup przedstawiono w tabeli 14. **Grupa pacjentów z mikroalbuminurią była starsza ($p<0,001$), charakteryzowała się statystycznie znaczącym dłuższym czasem trwania choroby ($p<0,001$), wyższym BMI, istotnie wyższym poziomem HbA1c ($p=0,04$), CRP ($p<0,001$), cystatyny C ($p<0,001$), istotnie wyższym dobowym poziomem wydalania albumin w moczu ($p<0,001$) oraz istotnie wyższym ciśnieniem skurczowym ($p<0,001$) i rozkurczowym ($p=0,005$).** Nie wykazano natomiast znaczących różnic między grupami w zakresie płci, wieku zachorowania na cukrzycę, poziomu kreatyniny, trójglicerydów oraz cholesterolu całkowitego i jego frakcji LDL- i HDL-cholesterolu w surowicy krwi (tab. 14).

Tab. 14. Parametry kliniczne i biochemiczne na początku badania u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 1A) oraz u pacjentów bez mikroalbuminurii (grupa 1B).

Tab. 14. Clinical and biochemical parameters of the children diagnosed with type 1 diabetes mellitus presenting with documented microalbuminuria (group 1A) and those without signs of microalbuminuria (group 1B) assessed at the time of beginning of the study.

Parametry kliniczne i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 1A / Group 1A (n=32)	Grupa 1B / Group 1B (n=153)	p
Wiek (lata) / Age (years)	14,94 ± 2,8*	11,4 ± 9,4	<0,001
Płeć (K/M) / Sex (F/M)	15/17	80/73	0,577
Czas trwania choroby (lata) <i>Duration of diabetes (years)</i>	8,14 ± 3,59*	3,76 ± 2,44	<0,001
Wiek zachorowania (lata) <i>The age at diagnosis (years)</i>	6,91 ± 3,26	8,31 ± 3,66	0,054
BMI (kg/m ²)	20,89 ± 3,46*	18,82 ± 3,18	0,002
C-peptyd / C-peptide (ng/ml)	< 0.5	< 0,5	–
Glukoza w surowicy (mg/dl) <i>Serum glucose</i>	160,26 ± 45,17	149,89 ± 69,1	0,113
HbA1c (%)	8,86 ± 1,79	8,21 ± 1,85	0,040

Parametry kliniczne i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 1A / Group 1A (n=32)	Grupa 1B / Group 1B (n=153)	p
CRP (mg/l)	2,11 ± 1,02*	1,41 ± 1,03	<0,001
Kreatynina / Creatinine (mg/dl)	0,77 ± 0,09	0,74 ± 0,13	0,183
Albuminuria (mg/dobę)	67,41 (32,0 – 244,0)*	9,89 (0,2 – 28,7)	<0,001
Cystatyna C / Cystatine C (mg/l)	0,85 ± 0,22*	0,61 ± 0,19	<0,001
Cholesterol całkowity <i>Total cholesterol</i> (mmol/l)	178,59 ± 41,17	166,81 ± 32,29	0,205
Cholesterol LDL <i>LDL-cholesterol</i> (mmol/l)	91,91 ± 29,45	86,26 ± 25,43	0,327
Cholesterol HDL <i>HDL-cholesterol</i> (mmol/l)	60,78 ± 12,79	61,16 ± 13,41	0,918
Trójglicerydy <i>Triglycerides</i> (mmol/l)	89,81 ± 42,67	80,12 ± 35,79	0,220
Ciśnienie skurczowe <i>Systolic blood pressure</i> (mmHg)	121,0 ± 12,0*	111,0 ± 11,0	<0,001
Ciśnienie rozkurczowe <i>Diastolic blood pressure</i> (mmHg)	76,0 ± 9,0*	71,0 ± 9,0*	0,005

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1A i grupą 1B ($p < 0,05$)

* statistical significance between group 1A and group 1B ($p < 0.05$)

4.5.2. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B na początku badania u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 1A) oraz u pacjentów bez mikroalbuminurii (grupa 1B)

Aktywność enzymu NAG ($p < 0,001$) i jego izoenzymów A ($p < 0,001$) i B ($p = 0,011$) w surowicy krwi ($p < 0,001$) oraz enzymu NAG ($p < 0,001$) i jego izoenzymów A ($p < 0,001$) i B ($p < 0,001$) w moczu u dzieci z udokumentowaną mikroalbuminurią była statystycznie znamienne wyższa w porównaniu do pacjentów, którzy nie rozwinęli objawów nefropatii cukrzycowej (tab. 15).

Tab. 15. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B na początku badania u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 1A) oraz u pacjentów bez mikroalbuminurii (grupa 1B).

Tab. 15. Activity of the NAG enzyme and its A and B isoforms in children diagnosed with type 1 diabetes mellitus presenting with documented microalbuminuria (group 1A) and those without signs of microalbuminuria (group 1B) assessed at the time of beginning of the study.

Parametry biochemiczne <i>Biochemical parameters</i>	Grupa 1A / Group 1A (n=32)	Grupa 1B / Group 1B (n=153)	p
NAG w surowicy <i>Serum NAG (U/l)</i>	40,79 ± 13,57*	28,32 ± 12,41	<0,001
NAG A w surowicy <i>Serum NAG A (U/l)</i>	33,02 ± 12,4*	21,89 ± 11,06	<0,001
NAG B w surowicy <i>Serum NAG B (U/l)</i>	7,84 ± 2,6*	6,45 ± 2,9	0,011
NAG w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG (U/g cr.)</i>	28,38 ± 9,4*	15,59 ± 8,07	<0,001
NAG A w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG A (U/g cr.)</i>	22,45 ± 6,91*	11,26 ± 5,78	<0,001
NAG B w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG B (U/g cr.)</i>	5,99 ± 2,48*	3,8 ± 1,85	<0,001

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1A i grupą 1B ($p < 0,05$)

* *statistical significance between group 1A and group 1B ($p < 0.05$)*

4.5.3. Parametry immunologiczne na początku badania u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 1A) oraz u pacjentów bez mikroalbuminurii (grupa 1B)

W grupie pacjentów (grupa 1A), u których udokumentowano mikroalbuminurię stwierdzono znamienne statystycznie wyższe średnie wartości poziomu TNF- α ($p < 0,001$), IL-6 ($p = 0,011$), VEGF ($p < 0,001$) w surowicy krwi i IL-6 ($p = 0,009$) w moczu oraz istotnie niższe wartości poziomu IL-12 ($p < 0,001$) i IL-10 ($p < 0,001$) w surowicy krwi niż w grupie dzieci, u których nie rozwinęła się mikroalbuminuria (grupa 1B) (tab. 16).

Tab. 16. Parametry immunologiczne na początku badania u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 1A) oraz u pacjentów bez mikroalbuminurii (grupa 1B).

Tab. 16. Immunologic parameters of the children diagnosed with type 1 diabetes mellitus presenting with documented microalbuminuria (group 1A) and those without signs of microalbuminuria (group 1B) assessed at the time of beginning of the study.

Parametry immunologiczne <i>Immunologic parameters</i>	Grupa 1A <i>Group 1A</i> (n=32)	Grupa 1B <i>Group 1B</i> (n=153)	p
TNF- α w surowicy <i>Serum TNF-α (pg/ml)</i>	3,55 (0,00 – 10,4)*	1,07 (0,00 – 7,1)	<0,001
VEGF w surowicy <i>Serum VEGF (pg/ml)</i>	466,2 (217,3 – 926,5)*	199,7 (13,5 – 1064,1)	<0,001
IL-6 w surowicy <i>Serum IL-6 (pg/ml)</i>	2,79 (0,02 – 6,25)*	0,61 (0,00 – 1,8)	0,011
IL-6 w moczu (pg/g kreat.) <i>Urine IL-6 (pg/g cr.)</i>	3,29 (0,00 – 5,88)*	0,78 (0,00 – 2,36)	0,009
IL-12 w surowicy <i>Serum IL-12 (pg/ml)</i>	0,67 (0,00 – 3,7)*	2,07 (0,00 – 18,8)	<0,001
IL-10 w surowicy <i>Serum IL-10 (pg/ml)</i>	0,84 (0,00 – 4,4) *	1,81 (0,00 – 14,8)	<0,001

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1A i grupą 1B ($p < 0,05$)

* *statistical significance between group 1A and group 1B ($p < 0.05$)*

4.6. ANALIZA PORÓWNAWCZA PARAMETRÓW KLINICZNYCH, BIOCHEMICZNYCH I IMMUNOLOGICZNYCH PACJENTÓW Z MIKROALBUMINURIĄ I BEZ MIKROALBUMINURII Z GRUPĄ DZIECI ZDROWYCH

4.6.1. Parametry kliniczne i biochemiczne na początku badania u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 1A) i bez mikroalbuminurii (grupa 1B) oraz u dzieci zdrowych

Dzieci z przewlekłą cukrzycą typu 1 i z mikroalbuminurią (grupa 1A) oraz bez udokumentowanej mikroalbuminurii (grupa 1B) charakteryzowały się odpowiednio statystycznie znamienym wyższym poziomem HbA1c ($p^1 < 0,001$; $p^2 = 0,002$), CRP ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$), istotnie wyższym dobowym poziomem wydalania albumin w moczu ($p^1 < 0,001$; $p^2 = 0,005$), istotnie wyższym ciśnieniem skurczowym ($p^1 = 0,001$; $p^2 = 0,016$) i rozkurczowym ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$) oraz istotnie wyższym BMI ($p^1 < 0,001$;

$p^2 < 0,001$) w porównaniu do grupy dzieci zdrowych. Nie wykazano natomiast różnic statystycznie między grupą 1A i grupą kontrolną oraz grupą 1B i grupą dzieci zdrowych w zakresie poziomu kreatyniny w surowicy krwi. **Poziom cystatyny C ($p^1 < 0,001$), cholesterolu całkowitego ($p^1 = 0,012$), jego frakcji LDL-cholesterolu ($p^1 = 0,041$), był istotnie wyższy w grupie dzieci z mikroalbuminurią w porównaniu do dzieci zdrowych, ale nie różnił się istotnie porównując grupę dzieci bez objawów nefropatii cukrzycowej z grupą kontrolną ($p^2 = 0,539$) (tab 17).**

Tab. 17. Parametry kliniczne i biochemiczne na początku badania u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 1A) i bez mikroalbuminurii (grupa 1B) oraz u dzieci zdrowych.

Tab. 17. Clinical and biochemical parameters of the patients diagnosed with type 1 diabetes mellitus presenting with documented microalbuminuria (Group 1A), those without signs of microalbuminuria (Group 1B) and healthy children assessed at the time of beginning of the study.

Parametry kliniczne i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 1A <i>Group 1A</i> (n=32)	Grupa 1B <i>Group 1B</i> (n=153)	Grupa kontrolna <i>Control group</i> (n=86)	p
Wiek (lata) / <i>Age (years)</i>	14,94 ± 2,8 ¹	11,4 ± 9,4 ^{*2}	13,4 ± 4,1	0,079 ¹ 0,133 ²
Płeć (K/M) / <i>Sex (F/M)</i>	15/17	80/73	52/34	0,185 ¹ 0,222 ²
BMI (kg/m ²)	20,89 ± 3,46 ^{*1}	18,82 ± 3,18 ^{*2}	17,3 ± 2,6	<0,001 ¹ <0,001 ²
C-peptyd / <i>C-peptide</i> (ng/ml)	< 0,5	< 0,5	2,1 ± 0,4	–
Glukoza w surowicy <i>Serum glucose</i> (mg/dl)	160,26 ± 45,17 ^{*1}	149,89 ± 69,1 ^{*2}	88,8 ± 10,0	<0,001 ¹ <0,001 ²
HbA1c (%)	8,86 ± 1,79 ^{*1}	8,21 ± 1,85 ^{*2}	4,2 ± 0,34	<0,001 ¹ 0,002 ²
CRP (mg/l)	2,11 ± 1,02 ^{*1}	1,41 ± 1,03 ^{*2}	0,5 ± 0,4	<0,001 ¹ <0,001 ²
Kreatynina / <i>Creatinine</i> (mg/dl)	0,77 ± 0,09 ¹	0,74 ± 0,13 ²	0,7 ± 0,2	0,075 0,598
Albuminuria (mg/dobę)	67,41 (32,0 – 244,0) ^{*1}	9,89 (0,2 – 28,7) ^{*2}	3,07 (0,2 – 12,5)	<0,001 ¹ 0,005 ²
Cystatyna C / <i>Cystatine C</i> (mg/l)	0,85 ± 0,22 ^{*1}	0,61 ± 0,19 ²	0,6 ± 0,2	<0,001 ¹ 0,539 ²
Cholesterol całkowity <i>Total cholesterol</i> (mmol/l)	178,59 ± 41,17 ^{*1}	166,81 ± 32,29	157,6 ± 21,1	0,012 0,126
Cholesterol LDL <i>LDL-cholesterol</i> (mmol/l)	91,91 ± 29,45 ^{*1}	86,26 ± 25,43	71,3 ± 19,8	0,041 0,216
Cholesterol HDL <i>HDL-cholesterol</i> (mmol/l)	60,78 ± 12,79	61,16 ± 13,41	57,5 ± 9,7	0,173 0,211

Parametry kliniczne i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 1A <i>Group 1A</i> (n=32)	Grupa 1B <i>Group 1B</i> (n=153)	Grupa kontrolna <i>Control group</i> (n=86)	p
Trójglicerydy <i>Triglycerides</i> (mmol/l)	89,81 ± 42,67	80,12 ± 35,79	80,3 ± 39,2	0,143 0,243
Ciśnienie skurczowe <i>Systolic blood pressure</i> (mmHg)	121,0 ± 12,0* ¹	111,0 ± 11,0* ²	107,0 ± 8,0	<0,001 ¹ 0,016 ²
Ciśnienie rozkurczowe <i>Diastolic blood pressure</i> (mmHg)	76,0 ± 9,0* ¹	71,0 ± 9,0* ²	62,0 ± 6,0	<0,001 ¹ <0,001 ²

*¹ różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1A i grupą kontrolą (p<0,05)

*² różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1B i grupą kontrolą (p<0,05)

*¹ statistical significance between group 1A and control group (p<0.05)

*² statistical significance between group 1B and control group (p<0.05)

4.6.2. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B na początku badania u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 1A) i bez mikroalbuminurii (grupa 1B) oraz u dzieci zdrowych

Aktywność enzymu NAG ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$) i jego izoenzymów A ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$) i B ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$) w surowicy ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$) oraz enzymu NAG ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$) i jego izoenzymów A ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$) i B ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$) w moczu u dzieci z udokumentowaną mikroalbuminurią i bez objawu mikroalbuminurii była statystycznie znamienne wyższa w porównaniu do grupy dzieci zdrowych (tab. 18).

Tab. 18. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B na początku badania u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 1A) i bez mikroalbuminurii (grupa 1B) oraz u dzieci zdrowych.

Tab. 18. Activity of the NAG enzyme and its A and B isoforms in patients diagnosed with type 1 diabetes mellitus presenting with documented microalbuminuria (group 1A), those without signs of microalbuminuria (group 1B) and healthy children assessed at the time of beginning of the study.

Parametry biochemiczne <i>Biochemical parameters</i>	Grupa 1A <i>Group 1A</i> (n=32)	Grupa 1B <i>Group 1B</i> (n=153)	Grupa kontrolna <i>Control group</i> (n=86)	p
NAG w surowicy <i>Serum NAG</i> (U/l)	40,79 ± 13,57* ¹	28,32 ± 12,41* ²	14,64 ± 4,33	<0,001 ¹ <0,001 ²
NAG A w surowicy <i>Serum NAG A</i> (U/l)	33,02 ± 12,4* ¹	21,89 ± 11,06* ²	11,00 ± 4,08	<0,001 ¹ <0,001 ²

Parametry biochemiczne <i>Biochemical parameters</i>	Grupa 1A <i>Group 1A</i> (n=32)	Grupa 1B <i>Group 1B</i> (n=153)	Grupa kontrolna <i>Control group</i> (n=86)	p
NAG B w surowicy <i>Serum NAG B (U/l)</i>	7,84 ± 2,6* ¹	6,45 ± 2,9* ²	3,51 ± 1,47	<0,001 ¹ <0,001 ²
NAG w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG (U/g cr.)</i>	28,38 ± 9,4* ¹	15,59 ± 8,07* ²	6,5 ± 2,0	<0,001 ¹ <0,001 ²
NAG A w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG A (U/g cr.)</i>	22,45 ± 6,91* ¹	11,26 ± 5,78* ²	4,1 ± 1,5	<0,001 ¹ <0,001 ²
NAG B w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG B (U/g cr.)</i>	5,99 ± 2,48* ¹	3,8 ± 1,85* ²	2,3 ± 0,9	<0,001 ¹ <0,001 ²

*¹ różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1A i grupą kontrolą ($p < 0,05$)

*² różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1B i grupą kontrolą ($p < 0,05$)

*¹ *statistical significance between group 1A and control group ($p < 0.05$)*

*² *statistical significance between group 1B and control group ($p < 0.05$)*

4.6.3. Parametry immunologiczne na początku badania u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 1A) i bez mikroalbuminurii (grupa 1B) oraz u dzieci zdrowych

W dalszym etapie badań dokonano także oceny porównawczej badanych cytokin w grupie dzieci z mikroalbuminurią (grupa A) i bez udokumentowanej mikroalbuminurii (grupa B) z grupą dzieci zdrowych. **Dzieci z grupy 1A oraz z grupy 1B w porównaniu z dziećmi zdrowymi odpowiednio wykazywali statystycznie znamienne wyższe wartości poziomu TNF- α ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$) oraz VEGF ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$) w surowicy krwi.** Poziom IL-6 w surowicy krwi ($p^1 < 0,001$) i w moczu ($p^1 < 0,001$) był statystycznie znamienne wyższy w grupie pacjentów z mikroalbuminurią w porównaniu do grupy dzieci zdrowych. **Natomiast nie wykazano istotnych różnic w zakresie IL-6 w surowicy krwi i w moczu porównując grupę dzieci bez objawów nefropatii cukrzycowej z grupą kontrolną** Poziom IL-12 i IL-10 w surowicy krwi był wyższy u pacjentów z grupy 1A niż u dzieci zdrowych, ale różnice te nie były istotne statystycznie. Natomiast poziom IL-12 ($p^2 < 0,001$) oraz IL-10 ($p^2 < 0,001$) w surowicy krwi w grupie dzieci bez udokumentowanej mikroalbuminurii był statystycznie znamienne wyższy niż w grupie dzieci zdrowych (tab. 19).

Tab. 19. Parametry immunologiczne na początku badania u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 1A) oraz u pacjentów bez mikroalbuminurii (grupa 1B) oraz u dzieci zdrowych.

Tab. 19. Immunologic parameters of the patients diagnosed with type 1 diabetes mellitus presenting with documented microalbuminuria (group 1A), those without signs of microalbuminuria (group 1B) and healthy children assessed at the time of beginning of the study.

Parametry immunologiczne <i>Immunologic parameters</i>	Grupa 1A <i>Group 1A</i> (n=32)	Grupa 1B <i>Group 1B</i> (n=153)	Grupa kontrolna <i>Control group</i> (n=86)	p
TNF- α w surowicy <i>Serum TNF-α (pg/ml)</i>	3,55 (0,00 – 10,4)* ¹	1,07 (0,00 – 7,1)* ²	0,00 (0,00 – 0,00)	<0,001 ¹ <0,001 ²
VEGF w surowicy <i>Serum VEGF (pg/ml)</i>	466,2 (217,3 – 926,5)* ¹	199,7 (13,5–1064,1)* ²	60,0 (12,9 – 324,0)	<0,001 ¹ <0,001 ²
IL-6 w surowicy <i>Serum IL-6 (pg/ml)</i>	2,79 (0,02 – 6,25)* ¹	0,61 (0,00 – 1,8)	0,27 (0,00 – 1,2)	<0,001 ¹ 0,087 ²
IL-6 w moczu (pg/g kreat.) <i>Urine IL-6 (pg/g cr.)</i>	3,29 (0,00 – 5,88)* ¹	0,78 (0,00 – 2,36)	0,22 (0,00–1,19)	<0,001 ¹ 0,091 ²
IL-12 w surowicy <i>Serum IL-12 (pg/ml)</i>	0,67 (0,00 – 3,7) ¹	2,07 (0,00 – 18,8)*²	0,2 (0,00 – 2,5)	0,296 ¹ <0,001 ²
IL-10 w surowicy <i>Serum IL-10 (pg/ml)</i>	0,84 (0,00 – 4,4) ¹	1,81 (0,00 – 14,8)*²	0,1 (0,00 – 1,0)	0,068 ¹ <0,001 ²

*¹ różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1A i grupą kontrolą ($p < 0,05$)

*² różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1B i grupą kontrolą ($p < 0,05$)

*¹ *statistical significance between group 1A and control group ($p < 0.05$)*

*² *statistical significance between group 1B and control group ($p < 0.05$)*

4.7. CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA, BIOCHEMICZNA I IMMUNOLOGICZNA PACJENTÓW Z CUKRZYCĄ TYPU 1 PO 4 LATACH OBSERWACJI Z UWZGLĘDNIENIEM ROZWOJU MIKROALBUMINURII

Po 4 latach obserwacji wykazano u 40 (21%) spośród 185 badanych pacjentów mikroalbuminurię. Dodatkowo stwierdzono w grupie dzieci z udokumentowaną mikroalbuminurią u 10 pacjentów również retinopatię cukrzycową, a u 4 pacjentów jednocześnie zmiany w narządzie wzroku i nadciśnienie tętnicze. Natomiast u 18 pacjentów bez udokumentowanej mikroalbuminurii stwierdzono retinopatię cukrzycową, a u 4- retinopatię i nadciśnienie tętnicze (tab. 20).

Tab. 20. Współistniejące powikłania w grupie pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią i bez zmikroalbuminurii po 4 latach obserwacji.

Tab. 20. The list of coexistent complications in diabetic patients presenting with documented microalbuminuria and those without signs of microalbuminuria assessed after 4 years of clinical observation.

Pacjenci z mikroalbuminurią <i>Patients with microalbuminuria</i> Grupa 2A / Group 2A (n = 40)	Pacjenci bez mikroalbuminurii <i>Patients without microalbuminuria</i> Grupa 2B / Group 2B (n = 145)
10 retinopatia cukrzycowa <i>10 diabetic retinopathy</i>	18 retinopatia cukrzycowa <i>18 diabetic retinopathy</i>
4 współistnienie retinopatii cukrzycowej z nadciśnieniem tętniczym <i>4 diabetic retinopathy and hypertension</i>	4 współistnienie retinopatii cukrzycowej z nadciśnieniem tętniczym <i>4 diabetic retinopathy and hypertension</i>

4.7.1. Parametry kliniczne i biochemiczne po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 2A) i bez mikroalbuminurii (grupa 2B)

Dzieci z przewlekłą cukrzycą typu 1 i z mikroalbuminurią (grupa 2A) były starsze ($p=0,016$), charakteryzowały się statystycznie znamionym dłuższym czasem trwania choroby ($p=0,016$), istotnie wyższym poziomem HbA1c ($p<0,001$), CRP ($p<0,001$), cystatyny C w surowicy krwi, istotnie wyższym dobowym poziomem wydalania albuminu w moczu ($p<0,001$), istotnie wyższym ciśnieniem skurczowym ($p=0,007$) oraz istotnie wyższym BMI ($p=0,021$) w porównaniu do pacjentów bez udokumentowanej mikroalbuminurii (grupa 2B). Nie wykazano natomiast różnic znamienne statystycznych między badanymi grupami w zakresie płci pacjenta, poziomu kreatyniny, glukozy, trójglicerydów, cholesterolu całkowitego oraz jego frakcji HDL-cholesterolu i LDL-cholesterolu w surowicy krwi (tab. 22).

Tab. 21. Parametry kliniczne i biochemiczne po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 2A) oraz u pacjentów bez mikroalbuminurii (grupa 2B).

Tab. 21. Clinical and biochemical parameters of the patients with type 1 diabetes mellitus presenting with documented microalbuminuria (group 2A) and those without signs of microalbuminuria (group 2B) assessed after 4 years of clinical observation.

Parametry kliniczne i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 2A <i>Group 2A</i> (n=40)	Grupa 2B <i>Group 2B</i> (n=145)	p
Wiek (lata) / <i>Age (years)</i>	17,78 ± 3,25*	16,08 ± 3,95	0,016
Płeć (K/M) / <i>Sex (F/M)</i>	24/16	74/71	0,216
Czas trwania choroby (lata) <i>Duration of diabetes (years)</i>	9,43 ± 2,70*	8,16 ± 3,24	0,002
Wiek zachorowania (lata) <i>The age at diagnosis (years)</i>	8,50 ± 3,43	7,97 ± 3,67	0,416
BMI (kg/m ²)	21,5 ± 2,98*	20,16 ± 3,26	0,021
C-peptyd / <i>C-peptide (ng/ml)</i>	< 0,5	< 0,5	–
Glukoza w surowicy <i>Serum glucose (mg/dl)</i>	148,65 ± 50,19	136,43 ± 34,57	0,265
HbA1c (%)	9,36 ± 1,87*	8,24 ± 1,73	<0,001
CRP (mg/l)	3,37 ± 1,57*	1,58 ± 1,39	<0,001
Kreatynina / <i>Creatinine (mg/dl)</i>	0,79 ± 0,11	0,77 ± 0,12	0,312
Albuminuria (mg/dobę)	62,94 (31,2 – 274,0)*	12,85 (0,9 – 29,7)	<0,001
Cystatyna C / <i>Cystatine C (mg/l)</i>	0,86 ± 0,10*	0,65 ± 0,19	<0,001
Cholesterol całkowity <i>Total cholesterol (mmol/l)</i>	180,23 ± 35,12	172,63 ± 31,95	0,194
Cholesterol LDL <i>LDL-cholesterol (mmol/l)</i>	97,61 ± 31,92	94,35 ± 30,35	0,518
Cholesterol HDL <i>HDL-cholesterol (mmol)</i>	56,24 ± 12,34	56,72 ± 13,33	0,859
Trójglicerydy <i>Triglycerides (mmol/l)</i>	92,81 ± 43,02	85,63 ± 43,06	0,266
Ciśnienie skurczowe <i>Systoli blood pressure (mmHg)</i>	119,0 ± 8,0*	114,0 ± 13,0	0,007
Ciśnienie rozkurczowe <i>Diastolic blood pressure (mmHg)</i>	75,0 ± 8,0*	72,0 ± 7,0*	0,117

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 2A i grupą 2B (p<0,05)

* *statistical significance between group 2A and group 2B (p<0.05)*

4.7.2. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 2A) i bez mikroalbuminurii (grupa 2B)

Aktywność enzymu NAG ($p < 0,001$) i jego izoenzymów A ($p < 0,001$) i B ($p = 0,008$) w surowicy oraz enzymu NAG ($p < 0,001$) i jego izoenzymów A ($p < 0,001$) i B ($p = 0,014$) w moczu u dzieci z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 2A) była statystycznie znacznie wyższa w porównaniu do grupy pacjentów bez objawu mikroalbuminurii (grupa 2B) (tab. 22).

Tab. 22. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 2A) oraz u pacjentów bez mikroalbuminurii (grupa 2B).

Tab. 22. Activity of the NAG enzyme and its A and B isoforms in patients with type 1 diabetes mellitus presenting with documented microalbuminuria (group 2A) and those without signs of microalbuminuria (group 2B) assessed after 4 years of clinical observation.

Parametry biochemiczne <i>Biochemical parameters</i>	Grupa 2A <i>Group 2A</i> (n=40)	Grupa 2B <i>Group 2B</i> (n=145)	p
NAG w surowicy <i>Serum NAG (U/l)</i>	45,09 ± 15,79*	31,26 ± 13,59	<0,001
NAG A w surowicy <i>Serum NAG A (U/l)</i>	35,92 ± 15,17*	23,44 ± 12,16	<0,001
NAG B w surowicy <i>Serum NAG B (U/l)</i>	9,08 ± 2,18*	7,9 ± 2,73	0,008
NAG w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG (U/g cr.)</i>	34,36 ± 8,8*	19,13 ± 11,12	<0,001
NAG A w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG A (U/g cr.)</i>	25,67 ± 7,98*	14,67 ± 11,2	<0,001
NAG B w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG B (U/g cr.)</i>	8,43 ± 2,46*	5,06 ± 3,26	0,014

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 2A i grupą 2B ($p < 0,05$)

* *statistical significance between group 2A and group 2B ($p < 0.05$)*

4.7.3. Parametry immunologiczne po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 2A) i bez mikroalbuminurii (grupa 2B)

Dzieci z objawami mikroalbuminurii (grupa 2A) w porównaniu z dziećmi bez udokumentowanej mikroalbuminurii (grupa 2B) wykazywały statystycznie znamienne wyższe wartości poziomu TNF- α ($p<0,001$) i VEGF ($p<0,001$) w surowicy krwi oraz istotnie niższe wartości IL-12 ($p<0,001$) i IL-10 ($p<0,001$) w surowicy krwi (tab. 23).

Tab. 23. Parametry immunologiczne po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią (grupa 2A) oraz u pacjentów bez mikroalbuminurii (grupa 2B).

Tab. 23. Immunologic parameters of the patients with type 1 diabetes mellitus presenting with documented microalbuminuria (group 2A) and those without signs of microalbuminuria (group 2B) assessed after 4 years of clinical observation.

Parametry immunologiczne <i>Immunologic parameters</i>	Grupa 2A <i>Group 2A</i> (n=40)	Grupa 2B <i>Group 2B</i> (n=145)	p
TNF- α w surowicy <i>Serum TNF-α (pg/ml)</i>	5,52 (2,2 – 13,6)*	1,87 (0,00 – 17,34)	<0,001
VEGF w surowicy <i>Serum VEGF (pg/ml)</i>	579,9 (97,7 – 984,2)*	302,2 (19,3 – 1003,2)	<0,001
IL-12 w surowicy <i>Serum IL-12 (pg/ml)</i>	0,87 (0,00 – 6,78)*	2,47 (0,00 – 13,2)	<0,001
IL-10 w surowicy <i>Serum IL-10 (pg/ml)</i>	0,65 (0,00 – 5,3) *	2,84 (0,00 – 19,2)	<0,001

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 2A i grupą 2B ($p<0,05$)

* *statistical significance between group 2A and group 2B ($p<0.05$)*

4.8. OCENA PORÓWNAWCZA PARAMETRÓW KLINICZNYCH, BIOCHEMICZNYCH I IMMUNOLOGICZNYCH PACJENTÓW Z UTRWALONĄ MIKROALBUMINURIĄ, Z PROGRESJĄ ORAZ Z REGRESJĄ MIKROALBUMINURII

Dokonując oceny porównawczej grupy dzieci chorych na cukrzycę typu 1 z udokumentowaną mikroalbuminurią zarówno na początku badania jak i po 4 latach obserwacji (grupa 1.1) z grupą dzieci, u których po 4 latach rozwinęła się mikroalbuminuria

(grupa 1.2) oraz z grupą dzieci, u których po 4 latach obserwacji pod wpływem leczenia farmakologicznego mikroalbuminuria ustąpiła (grupa 1.3) nie wykazano statystycznie znamiennych różnic w zakresie wieku i płci pacjenta, czasu trwania choroby, BMI, poziomu HbA1c, CRP, kreatyniny, cystatyny C, wielkości ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego, parametrów gospodarki lipidowej oraz poziomu TNF- α , IL-10, IL-12, IL-6 w surowicy krwi i IL-6 w moczu pomiędzy grupą 1.1 i 1.2 oraz pomiędzy grupą 1.1 i 1.3. Ponadto nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie aktywności enzymu NAG i jego izoenzymu A i B zarówno w surowicy krwi jak i w moczu pomiędzy grupą 1.1 i 1.2 oraz aktywności enzymu NAG i jego izoenzymu A i B w surowicy krwi pomiędzy grupą 1.1 i 1.3. **Istotne różnice wykazano tylko w zakresie wielkości dobowego wydalania albumin w moczu ($p < 0,001$) pomiędzy grupą 1.1 a 1.2 oraz aktywności enzymu NAG ($p = 0,012$), jego izoenzymu A ($p = 0,015$) i B ($p = 0,044$) w moczu i poziomu VEGF ($p = 0,010$) w surowicy krwi porównując grupę pacjentów z utrwaloną mikroalbuminurią zarówno na początku jak i na końcu badania (grupa 1.1) z grupą dzieci, u których po 4 latach obserwacji pod wpływem leczenia farmakologicznego mikroalbuminuria ustąpiła (grupa 1.3) (tab. 24, 25, 26).**

Tab. 24. Parametry kliniczne i biochemiczne u pacjentów z utrwaloną mikroalbuminurią zarówno na początku badania jak i po 4 latach obserwacji (grupa 1.1), z progresją mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji (grupa 1.2), z regresją mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji (grupa 1.3).

Tab. 24. Clinical and biochemical parameters of the patients with type 1 diabetes mellitus having persistent microalbuminuria both at the beginning of the study and after 4 years of clinical observation (group 1.1), those with progression of microalbuminuria after 4 years of clinical observation (group 1.2) and those with regression of microalbuminuria after 4 years of clinical observation (group 1.3).

Parametry kliniczne i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 1.1 <i>Group 1.1</i> (n = 8)	Grupa 1.2 <i>Group 1.2</i> (n = 32)	Grupa 1.3 <i>Group 1.3</i> (n = 24)	p
Wiek (lata) / <i>Age (years)</i>	14,63 $\pm$ 2,50	13,56 $\pm$ 3,40	15,04 $\pm$ 2,94	0,624 ¹ 0,794 ²
Płeć (K/M) / <i>Sex (F/M)</i>	6/2	18/14	9/15	0,231 ¹ 0,135 ²
Czas trwania choroby (lata) <i>Duration of diabetes (years)</i>	6,50 $\pm$ 2,39	5,19 $\pm$ 2,81	8,69 $\pm$ 3,80	0,116 ¹ 0,157 ²
Wiek zachorowania (lata) <i>The age at diagnosis (years)</i>	8,50 $\pm$ 2,78	7,50 $\pm$ 3,61	6,38 $\pm$ 3,28	0,803 ¹ 0,107 ²

Parametry kliniczne i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 1.1 <i>Group 1.1</i> (n = 8)	Grupa 1.2 <i>Group 1.2</i> (n = 32)	Grupa 1.3 <i>Group 1.3</i> (n = 24)	p
BMI (kg/m ²)	20,02 ± 4,72	19,55 ± 3,31	21,19 ± 2,98	1,000 ¹ 0,443 ²
HbA1c (%)	8,85 ± 2,25	8,54 ± 1,34	8,87 ± 1,67	-
CRP (mg/l)	1,59 ± 0,72	1,81 ± 1,02	2,28 ± 1,06	0,813 ¹ 0,078 ²
Kreatynina / <i>Creatinine</i> (mg/dl)	0,78 ± 0,07	0,77 ± 0,14	0,77 ± 0,09	0,600 ¹ 0,695 ²
Albuminuria (mg/dobę)	61,74 (35,9 – 120,0)* ¹	14,08 (0,7 – 28,7)	69,31 (32,4 – 244,0)	<0,001 ¹ 0,965
Cystatyna C / <i>Cystatine C</i> (mg/l)	0,72 ± 0,31	0,71 ± 0,17	0,88 ± 0,16	0,855 ¹ 0,061 ²
Cholesterol całkowity <i>Total cholesterol</i> (mmol/l)	188,00 ± 53,52	168,78 ± 41,35	175,46 ± 37,3	0,344 ¹ 0,777 ²
Cholesterol LDL <i>LDL-cholesterol</i> (mmol/l)	99,88 ± 35,37	81,75 ± 23,09	89,25 ± 27,55	0,272 ¹ 0,542 ²
Cholesterol HDL <i>HDL-cholesterol</i> (mmol/l)	64,75 ± 9,54	62,44 ± 13,32	59,46 ± 13,62	0,532 ¹ 0,338 ²
Trójglicerydy <i>Triglycerides</i> (mmol/l)	80,38 ± 33,32	83,09 ± 44,55	92,96 ± 45,56	0,852 ¹ 0,572 ²
Ciśnienie skurczowe <i>Systolic blood pressure</i> (mmHg)	122,0 ± 14,0	113,0 ± 13,0	121,0 ± 11,0	0,128 ¹ 0,983 ²
Ciśnienie rozkurczowe <i>Diastolic blood pressure</i> (mmHg)	77,0 ± 9,0	72,0 ± 11,0	76,0 ± 9,0	0,166 ¹ 0,648 ²

*¹ różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1.1 i grupą 1.2 (p<0,05)

*² różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1.1 i grupą 1.3 (p<0,05)

*¹ statistical significance between group 1.1. and group 1.2. (p<0.05)

*² statistical significance between group 1.1. and group 1.3. (p<0.05)

Tab. 25. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B u pacjentów z utrwaloną mikroalbuminurią zarówno na początku badania jak i po 4 latach obserwacji (grupa 1.1), z progresją mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji (grupa 1.2), z regresją mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji (grupa 1.3).

Tab. 25. Activity of the NAG enzyme and its A and B isoforms in patients with type 1 diabetes mellitus having persistent microalbuminuria both at the beginning of the study and after 4 years of clinical observation (group 1.1), those with progression of microalbuminuria after 4 years of clinical observation (group 1.2) and those with regression of microalbuminuria after 4 years of clinical observation (group 1.3).

Parametry kliniczne i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 1.1 <i>Group 1.1</i> (n = 8)	Grupa 1.2 <i>Group 1.2</i> (n = 32)	Grupa 1.3 <i>Group 1.3</i> (n = 24)	p
NAG w surowicy <i>Serum NAG</i> (U/l)	42,08 ± 11,78	40,36 ± 14,32	36,42 ± 16,82	0,317 ¹ 0,257 ²
NAG A w surowicy <i>Serum NAG A</i> (U/l)	33,05 ± 9,39	33,01 ± 13,43	29,27 ± 15,0	0,319 ¹ 0,151 ²
NAG B w surowicy <i>Serum NAG B</i> (U/l)	9,34 ± 2,29	7,34 ± 2,54	7,05 ± 2,87	0,122 ¹ 0,052 ²

Parametry kliniczne i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 1.1 <i>Group 1.1</i> (n = 8)	Grupa 1.2 <i>Group 1.2</i> (n = 32)	Grupa 1.3 <i>Group 1.3</i> (n = 24)	p
NAG w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG (U/g cr.)</i>	30,50 ± 6,75* ²	27,67 ± 8,37	22,58 ± 9,70	0,327 ¹ 0,012²
NAG A w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG A (U/g cr.)</i>	24,02 ± 5,96* ²	21,93 ± 7,24	17,05 ± 7,59	0,361 ¹ 0,015²
NAG B w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG B (U/g cr.)</i>	6,73 ± 3,20* ²	5,74 ± 2,23	4,61 ± 2,35	0,267 ¹ 0,044²

*¹ różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1.1 i grupą 1.2 (p<0,05)

*² różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1.1 i grupą 1.3 (p<0,05)

*¹ statistical significance between group 1.1. and group 1.2. (p<0.05)

*² statistical significance between group 1.1. and group 1.3. (p<0.05)

Tab. 26. Parametry immunologiczne u pacjentów z utrwaloną mikroalbuminurią zarówno na początku badania jak i po 4 latach obserwacji (grupa 1.1), z progresją mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji (grupa 1.2), z regresją mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji (grupa 1.3).

Tab. 26. Immunologic parameters of the patients with type 1 diabetes mellitus having persistent microalbuminuria both at the beginning of the study and after 4 years of clinical observation (group 1.1), those with progression of microalbuminuria after 4 years of clinical observation (group 1.2) and those with regression of microalbuminuria after 4 years of clinical observation (group 1.3).

Parametry immunologiczne <i>Immunologic parameters</i>	Grupa 1.1 <i>Group 1.1</i> (n = 8)	Grupa 1.2 <i>Group 1.2</i> (n = 32)	Grupa 1.3 <i>Group 1.3</i> (n = 24)	p
TNF-α w surowicy <i>Serum TNF-α (pg/ml)</i>	3,66 (1,30 – 9,54)	3,51 (0,00 – 10,40)	2,73 (0,00 – 7,10)	0,612 ¹ 0,699 ²
IL-6 w surowicy <i>Serum IL-6 (pg/ml)</i>	3,02 (0,83 – 6,25)	1,12 (0,02 – 2,30)	1,84 (0,00 – 5,60)	0,111 ¹ 0,096 ²
IL-6 w moczu (pg/g kreat.) <i>Urne IL-6 (pg/g cr.)</i>	2,91 (0,00 – 5,88)	1,31 (0,00 – 3,12)	1,99 (0,20 – 5,77)	0,114 ¹ 0,324 ²
IL-12 w surowicy <i>Serum IL-12 (pg/ml)</i>	0,51 (0,00 – 2,20)	0,72 (0,00 – 3,70)	0,92 (0,00 – 5,07)	0,344 ¹ 0,679 ²
IL-10 w surowicy <i>Serum IL-10 (pg/ml)</i>	0,61 (0,00 – 1,90)	0,91 (0,00 – 4,40)	0,94 (0,00 – 5,20)	0,685 ¹ 0,744 ²
VEGF w surowicy <i>Serum VEGF (pg/ml)</i>	452,31 (284,30 – 772,73)* ²	470,81 (217,29 – 926,47)	321,42 (57,95 – 1064,10)	0,965 ¹ 0,010²

*¹ różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1.1 i grupą 1.2 (p<0,05)

*² różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1.1 i grupą 1.3 (p<0,05)

*¹ statistical significance between group 1.1. and group 1.2. (p<0.05)

*² statistical significance between group 1.1. and group 1.3. (p<0.05)

4.9. OCENA PORÓWNAWCZA PARAMETRÓW KLINICZNYCH, BIOCHEMICZNYCH I IMMUNOLOGICZNYCH PACJENTÓW Z PROGRESJĄ, Z REGRESJĄ MIKROALBUMINURII ORAZ BEZ UDOKUMENTOWANEJ MIKROALBUMINURII

Pacjenci, u których po 4 latach obserwacji rozwinęła się mikroalbuminuria (grupa 1.2) w porównaniu do grupy pacjentów, u których w trakcie 4 lat trwającego badania, pod wpływem leczenia farmakologicznego ustąpiła mikroalbuminuria (grupa 1.3), charakteryzowali się statystycznie znamionym krótszym czasem trwania choroby, niższym dobowym wydalaniem albumin w moczu oraz niższym ciśnieniem skurczowym. Ponadto **w grupie 1.2 wykazano istotnie wyższe wartości enzymu NAG ($p=0,013$), jego izoenzymu A ($p=0,014$) i B ($p=0,035$) i w moczu oraz VEGF ($p=0,001$) w surowicy krwi w odniesieniu do grupy 1.3.** Natomiast poziom TNF, IL-6, IL-12, IL-10, cystatyny C w surowicy krwi nie różnił się istotnie pomiędzy grupą 1.2 i 1.3.

W dalszym etapie badań dokonano oceny porównawczej grupy dzieci z cukrzycą typu 1, u których mikroalbuminurię wykryto w trakcie 4 lat obserwacji (grupa 1.2) z grupą pacjentów, u których zarówno na początku jak i po 4 latach badania nie stwierdzono mikroalbuminurii (grupa 1.4). **Dzieci z badanej grupy 1.2 były starsze ($p=0,009$), charakteryzowały się dłuższym czasem trwania cukrzycy typu 1 ($p<0,001$), istotnie wyższym poziomem HbA1c ($p=0,032$), CRP ($p=0,005$) oraz dobowym wydalaniem albumin w moczu ($p<0,001$). Ponadto stwierdzono w grupie 1.2 statystycznie znamienne wyższe wartości aktywności enzymu NAG ($p<0,001$) i jego izoenzymu A ($p<0,001$), TNF- α ($p<0,001$), VEGF ($p<0,001$) w surowicy krwi oraz enzymu NAG ($p<0,001$), jego izoenzymu A ($p<0,001$) i B ($p=0,022$) w moczu w porównaniu do grupy 1.4. Wykazano ponadto istotnie niższy poziom IL-12 ($p<0,001$) i IL-10 ($p=0,022$) w surowicy krwi w grupie 1.2 w odniesieniu do grupy 1.4 (tab. 27, 28, 29).**

Tab. 27. Parametry kliniczne i biochemiczne u pacjentów z progresją mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji (grupa 1.2), z regresją mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji (grupa 1.3) oraz bez udokumentowanej mikroalbuminurii zarówno na początku badania jak i po 4 latach obserwacji (grupa 1.4).

Tab. 27. Clinical and biochemical parameters of the patients diagnosed with type 1 diabetes mellitus having progression of microalbuminuria after 4 years of clinical observation (group 1.2), those with regression of microalbuminuria after 4 years of clinical observation (group 1.3) and those with no sign of microalbuminuria neither at the beginning of the study nor after 4 years of clinical observation (group 1.4).

Parametry kliniczne i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 1.2 <i>Group 1.2</i> (n=32)	Grupa 1.3 <i>Group 1.3</i> (n = 24)	Grupa 1.4 <i>Group 1.4</i> (n=121)	p
Wiek (lata) / <i>Age (years)</i>	13,56 ± 3,40* ²	15,04 ± 2,94	11,51 ± 3,86	0,090 ¹ 0,009 ²
Płeć (K/M) / <i>Sex (F/M)</i>	18/14	9/15	62/59	0,256 ¹ 0,145 ²
Czas trwania choroby (lata) <i>Duration of diabetes (years)</i>	5,19 ± 2,81* ¹ * ²	8,69 ± 3,80	3,38 ± 2,19	<0,001 ¹ <0,001 ²
Wiek zachorowania (lata) <i>The age at diagnosis (years)</i>	7,50 ± 3,61	6,38 ± 3,28	8,26 ± 3,68	0,062 ¹ 0,740 ²
BMI (kg/m ²)	19,55 ± 3,31	21,19 ± 2,98	18,62 ± 3,13	0,061 ¹ 0,165 ²
HbA1c (%)	8,54 ± 1,34* ²	8,87 ± 1,67	8,12 ± 1,96	0,503 ¹ 0,032 ²
CRP (mg/l)	1,81 ± 1,02* ²	2,28 ± 1,06	1,30 ± 1,01	0,091 ¹ 0,005 ²
Kreatynina/ <i>Creatinine</i> (mg/dl)	0,77 ± 0,14	0,77 ± 0,09	0,74 ± 0,13	0,810 ¹ 0,262 ²
Albuminuria (mg/dobę)	14,08 (0,7 – 28,7)* ¹ * ²	69,31 (32,4 – 244,0)	8,79 (0,2-23,98)	<0,001 ¹ <0,001 ²
Cystatyna C / <i>Cystatine C</i> (mg/l)	0,88 ± 0,16	0,70 ± 0,17	0,58 ± 0,19	0,156 ¹ 0,013 ²
Cholesterol całkowity <i>Total cholesterol</i> (mmol/l)	168,78 ± 41,35	175,46 ± 37,03	166,29 ± 29,63	0,492 ¹ 0,900 ²
Cholesterol LDL <i>LDL-cholesterol</i> (mmol/l)	81,75 ± 23,09	89,25 ± 27,55	87,45 ± 25,97	0,408 ¹ 0,555 ²
Cholesterol HDL <i>HDL-cholesterol</i> (mmol/l)	62,44 ± 13,32	59,46 ± 13,62	60,82 ± 13,47	0,643 ¹ 0,655 ²
Trójglicerydy <i>Triglycerides</i> (mmol/l)	83,09 ± 44,55	92,96 ± 45,56	79,33 ± 33,27	0,264 ¹ 0,930 ²
Ciśnienie skurczowe <i>Systolic blood pressure</i> (mmHg)	113,0 ± 13,0* ¹	121,0 ± 11,0	111,0 ± 10,0	0,047 ¹ 0,280 ²
Ciśnienie rozkurczowe <i>Diastolic blood pressure</i> (mmHg)	72,0 ± 11,0	76,0 ± 9,0	70,0 ± 8,0	0,134 ¹ 0,696 ²

*¹ różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1.2. i grupą 1.3. (p<0,05)

*² różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1.2 i grupą 1.4 (p<0,05)

*¹ *statistical significance between group 1.2. and group 1.3. (p<0.05)*

*² *statistical significance between group 1.2. and group 1.4. (p<0.05)*

Tab. 28. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B u pacjentów z progresją mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji (grupa 1.2), z regresją mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji (grupa 1.3) oraz bez udokumentowanej mikroalbuminurii zarówno na początku badania jak i po 4 latach obserwacji (grupa 1.4).

Tab. 28. Activity of the NAG enzyme and its A and B isoforms in patients diagnosed with type 1 diabetes mellitus having progression of microalbuminuria after 4 years of clinical observation (group 1.2), those with regression of microalbuminuria after 4 years of clinical observation (group 1.3) and those with no sign of microalbuminuria neither at the beginning of the study nor after 4 years of clinical observation (group 1.4).

Parametry biochemiczne <i>Biochemical parameters</i>	Grupa 1.2 <i>Group 1.2</i> (n = 32)	Grupa 1.3 <i>Group 1.3</i> (n=24)	Grupa 1.4 <i>Group 1.4</i> (n = 121)	p
NAG w surowicy <i>Serum NAG (U/l)</i>	40,36 ± 14,32 ^{*2}	36,42 ± 16,82	26,16 ± 9,96	0,329 ¹ 0,001 ²
NAG A w surowicy <i>Serum NAG A (U/l)</i>	33,01 ± 13,43 ^{*2}	29,27 ± 15,0	19,93 ± 8,83	0,275 ¹ <0,001 ²
NAG B w surowicy <i>Serum NAG B (U/l)</i>	7,34 ± 2,54	7,05 ± 2,87	6,29 ± 2,90	0,716 ¹ 0,161 ²
NAG w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG (U/g cr.)</i>	27,67 ± 8,37 ^{*1*2}	22,58 ± 9,70	13,74 ± 6,46	0,013 ¹ <0,001 ²
NAG A w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG A (U/g cr.)</i>	21,93 ± 7,24 ^{*1*2}	17,05 ± 7,59	9,73 ± 4,01	0,014 ¹ <0,001 ²
NAG B w moczu (U/g. kreat.) <i>Urine NAG B (U/g cr.)</i>	5,74 ± 2,23 ^{*1*2}	4,61 ± 2,35	3,58 ± 1,64	0,035 ¹ 0,022 ²

^{*1} różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1.2. i grupą 1.3. ($p < 0,05$)

^{*2} różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1.2 i grupą 1.4 ($p < 0,05$)

^{*1} statistical significance between group 1.2 and group 1.3 ($p < 0.05$)

^{*2} statistical significance between group 1.2 and group 1.4 ($p < 0.05$)

Tab. 29. Parametry immunologiczne u pacjentów z progresją mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji (grupa 1.2), z regresją mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji (grupa 1.3) oraz bez udokumentowanej mikroalbuminurii zarówno na początku badania jak i po 4 latach obserwacji (grupa 1.4).

Tab. 29. Immunologic parameters of the patients diagnosed with type 1 diabetes mellitus having progression of microalbuminuria after 4 years of clinical observation (group 1.2), those with regression of microalbuminuria after 4 years of clinical observation (group 1.3) and those with no sign of microalbuminuria neither at the beginning of the study nor after 4 years of clinical observation (group 1.4).

Parametry immunologiczne <i>Immunologic parameters</i>	Grupa 1.2 <i>Group 1.2</i> (n = 32)	Grupa 1.3 <i>Group 1.3</i> (n=24)	Grupa 1.4 <i>Group 1.4</i> (n = 121)	p
TNF- α w surowicy <i>Serum TNF-α (pg/ml)</i>	3,51 (0,00 – 10,40)* ²	2,73 (0,00 – 7,10)	0,63 (0,00 – 5,3)	0,214 ¹ <0,001 ²
VEGF w surowicy <i>Serum VEGF (pg/ml)</i>	470,81 (217,29–926,47)* ^{1*2}	321,42 (57,95 – 1064,10)	167,55 (13,45 – 731,58)	0,001 ¹ <0,001 ²
IL-6 w surowicy <i>Serum IL-6 (pg/ml)</i>	1,12 (0,02–2,30)	1,84 (0,00 – 5,60)	0,83 (0,00 – 2,53)	0,076 ¹ 0,113 ²
IL-6 w moczu (pg/g kreat.) <i>Urine IL-6 (pg/g cr.)</i>	1,31 (0,00– 3,12)	1,99 (0,20 – 5,77)	1,10 (0,00 – 2,36)	0,091 ¹ 0,107 ²
IL-12 w surowicy <i>Serum IL-12 (pg/ml)</i>	0,72 (0,00 – 3,70)* ²	0,92 (0,00 – 5,07)	2,37 (0,00 – 18,80)	0,297 ¹ <0,001 ²
IL-10 w surowicy <i>Serum TNF-α (pg/ml)</i>	0,91 (0,00 – 4,40)* ²	0,94 (0,00 – 5,20)	2,04 (0,00 – 14,80)	0,967 ¹ 0,022 ²

*¹ różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1.2 i grupą 1.3 ($p < 0,05$)

*² różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1.2 i grupą 1.4 ($p < 0,05$)

*¹ *statistical significance between group 1.2 and group 1.3 ($p < 0.05$)*

*² *statistical significance between group 1.2 and group 1.4 ($p < 0.05$)*

4.10. ANALIZA KORELACJI TNF- α Z PARAMETRAMI KLINICZNYMI, BIOCHEMICZNYMI I IMMUNOLOGICZNYMI U PACJENTÓW Z CUKRZYCĄ TYPU 1)

4.10.1. Analiza korelacji TNF- α z parametrami klinicznymi i biochemicznymi u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2)

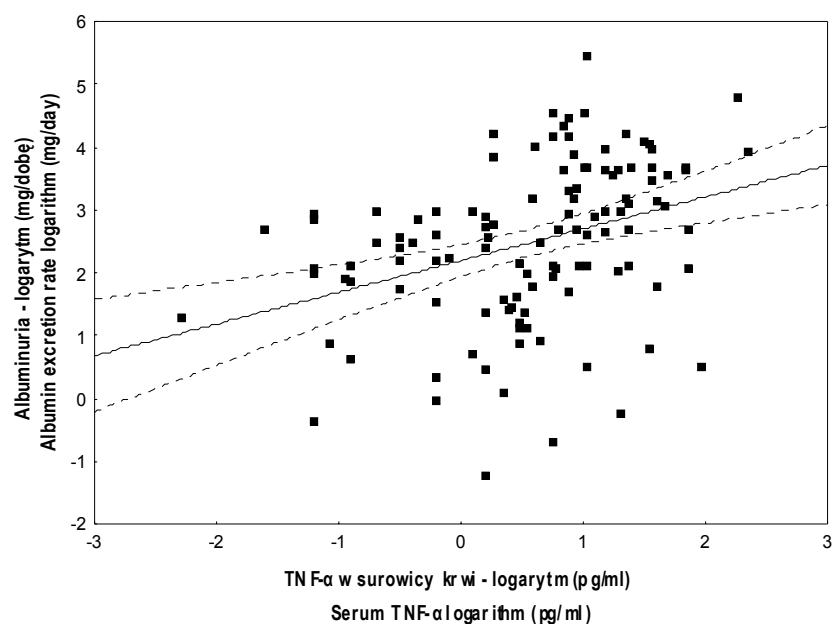
W grupie dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2) stwierdzono dodatnią statystycznie zmienną korelację pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy krwi a wiekiem pacjenta ($R=0,16$, $p^1=0,028$; $R=0,26$ $p^2<0,001$), czasem trwania choroby ($R=0,24$, $p^1=0,001$; $R=0,37$, $p^2<0,001$), poziomem CRP ($R=0,33$, $p^1<0,001$; $R=0,51$, $p^2<0,001$), poziomem HbA1c

($R=0,19$, $p^1=0,009$; $R=0,37$, $p^2<0,001$), poziomem cystatyny C ($R=0,29$, $p^1<0,001$; $R=0,52$, $p<0,001$) oraz wielkością wydalania albumin w moczu ($R=0,36$, $p^1<0,001$; $R=0,62$, $p^2<0,001$). Nie wykazano statystycznie znamiennych korelacji pomiędzy poziomem TNF- α a poziomem kreatyniny, wielkością ciśnienia skurczowego i rozkurczowego u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania, natomiast po 4 latach obserwacji stwierdzono istotne korelacje pomiędzy badaną cytokiną a poziomem kreatyniny ($R=0,27$, $p^2<0,001$), wielkością ciśnienia skurczowego ($R=0,21$; $p^2<0,003$) i ciśnienia rozkurczowego ($R=0,15$; $p^2<0,041$) (tab. 30, ryc. 3-6).

Tab. 30. Wyniki korelacji TNF α w grupie 1 oraz grupie 2 z parametrami klinicznymi i biochemicznymi.

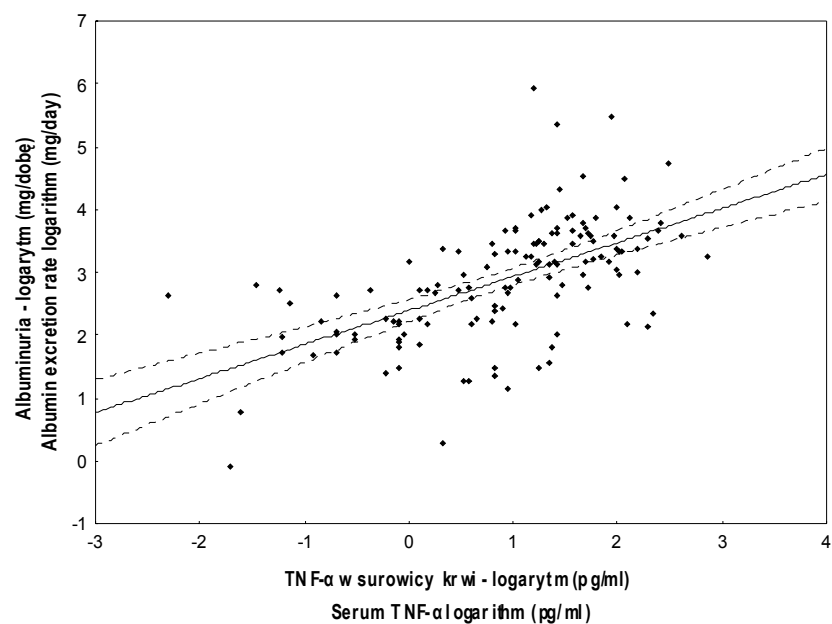
Tab. 30. The results of the correlation analysis between TNF α and clinical and biochemical parameters characterizing patients of the group 1 and the group 2 respectively.

TNF-α (pg/ml) surowica / serum Grupa / Group	Wiek (lata) Age (years)	Czas trwania choroby (lata) Duration of diabetes (years)	CRP (mg/l)	HbA1c (%)	Kreatynina Creatinine (mg/dl)
Grupa 1 / Group 1	$R = 0,16$ $p = 0,028$	$R = 0,24$ $p < 0,001$	$R = 0,33$ $p < 0,001$	$R = 0,19$ $p = 0,009$	$R = 0,11$ $p = 0,125$
Grupa 2 / Group 2	$R = 0,26$ $p < 0,001$	$R = 0,37$ $p < 0,001$	$R = 0,51$ $p < 0,001$	$R = 0,37$ $p < 0,001$	$R = 0,27$ $p < 0,001$



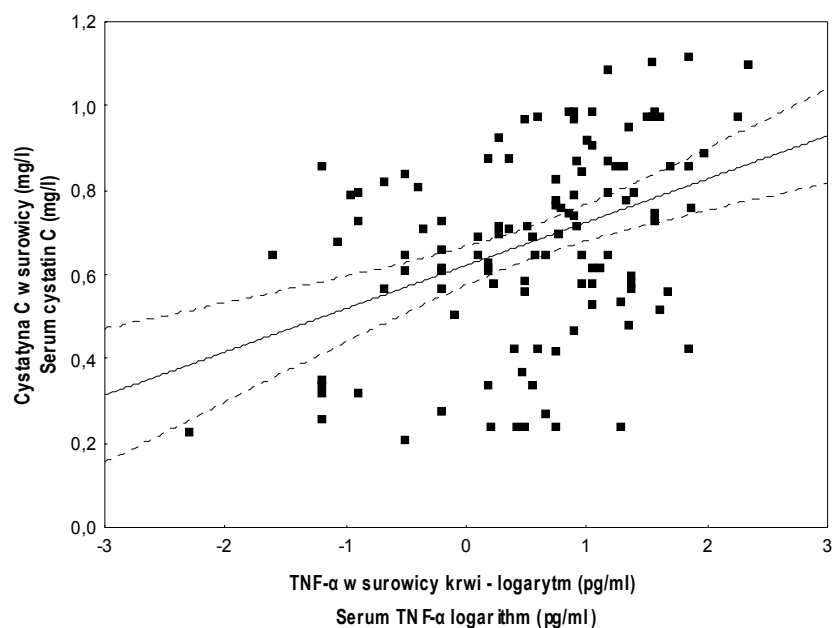
Ryc. 3. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy a dobowym wydalaniem albumin w badanej grupie 1 ($R=0,36$; $p<0,001$).

Fig. 3. Correlation between serum TNF- α levels and albumin excretion rate in the examined group 1 ($R=0.36$; $p<0.001$).



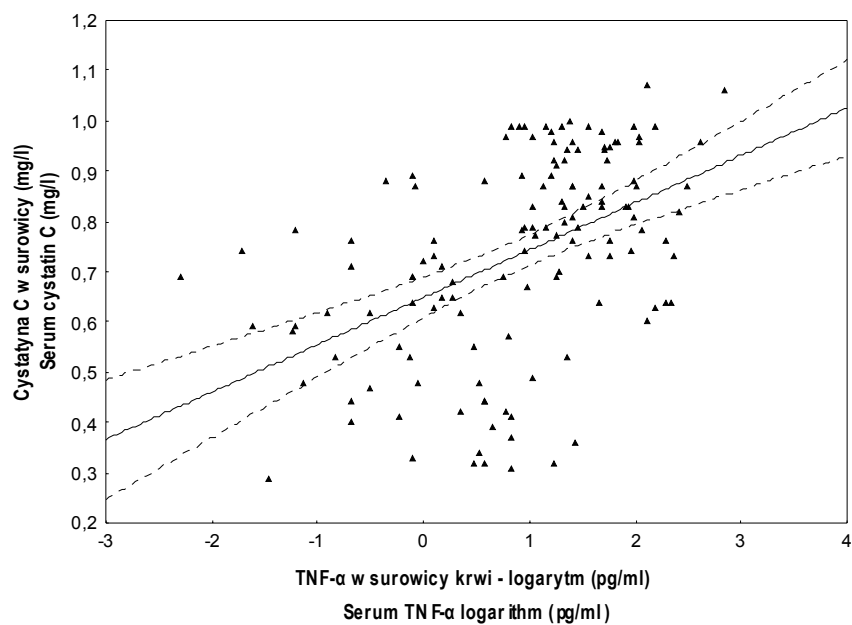
Ryc. 4. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy a dobowym wydalaniem albumin w badanej grupie 2 ($R=0,62$; $p<0,001$).

Fig. 4. Correlation between serum TNF- α levels and albumin excretion rate in the examined group 2 ($R=0.62$; $p<0.001$).



Ryc. 5. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α a poziomem cystatyny C w surowicy w badanej grupie 1 ($R=0,29$; $p<0,001$).

Fig. 5. Correlation between serum TNF- α and serum cystatin C levels in the examined group 1 ($R=0.29$; $p<0.001$).

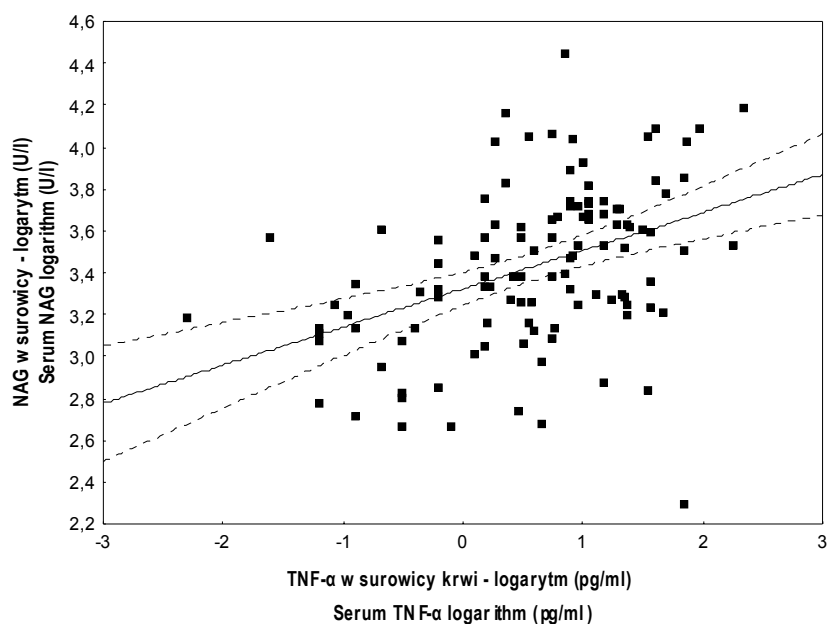


Ryc. 6. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α a poziomem cystatyny C w surowicy w badanej grupie 2 ($R=0,52$; $p<0,001$).

Fig. 6. Correlation between serum TNF- α and serum cystatin C levels in the examined group 2 ($R=0.52$; $p<0.001$).

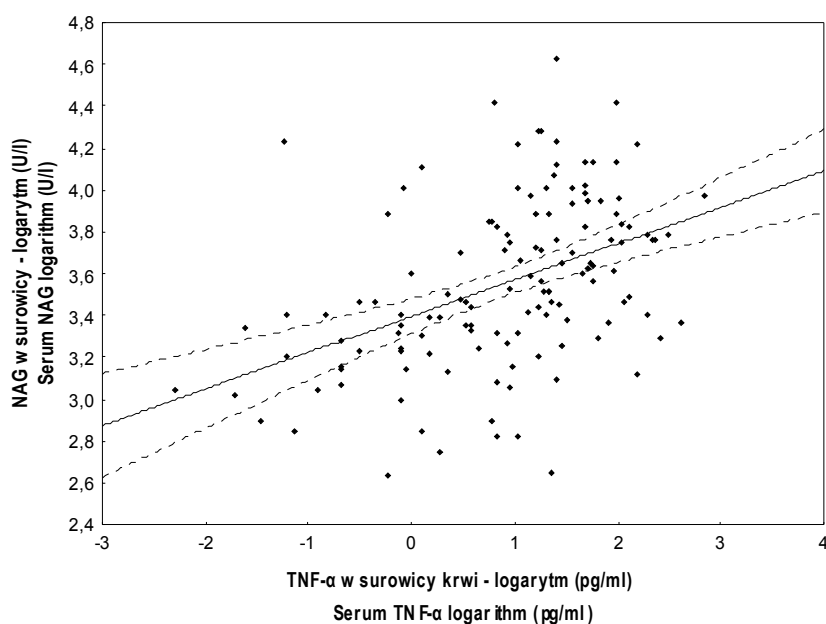
4.10.2. Analiza korelacji TNF- α z enzymem NAG i jego izoenzymami A i B w surowicy i w moczu u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2)

U dzieci z cukrzycą typu 1 zarówno na początku badania (grupa 1) jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2) stwierdzono dodatnią statystycznie zmienną korelację pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy krwi a aktywnością enzymu NAG ($R=0,45$, $p^1<0,001$; $R=0,56$, $p^2<0,001$), i jego izoenzymów A ($R=0,44$, $p^1<0,001$; $R=0,56$, $p^2<0,001$) i B ($R=0,21$, $p^1=0,004$; $R=0,34$, $p^2<0,001$), w surowicy krwi oraz enzymu NAG ($R=0,49$, $p^1<0,001$; $R=0,71$, $p^2<0,001$) i jego izoenzymów A ($R=0,46$, $p^1<0,001$; $R=0,68$, $p^2<0,001$) i B ($R=0,29$, $p^1<0,001$; $R=0,64$, $p^2<0,001$) w moczu (ryc. 7 – 20).



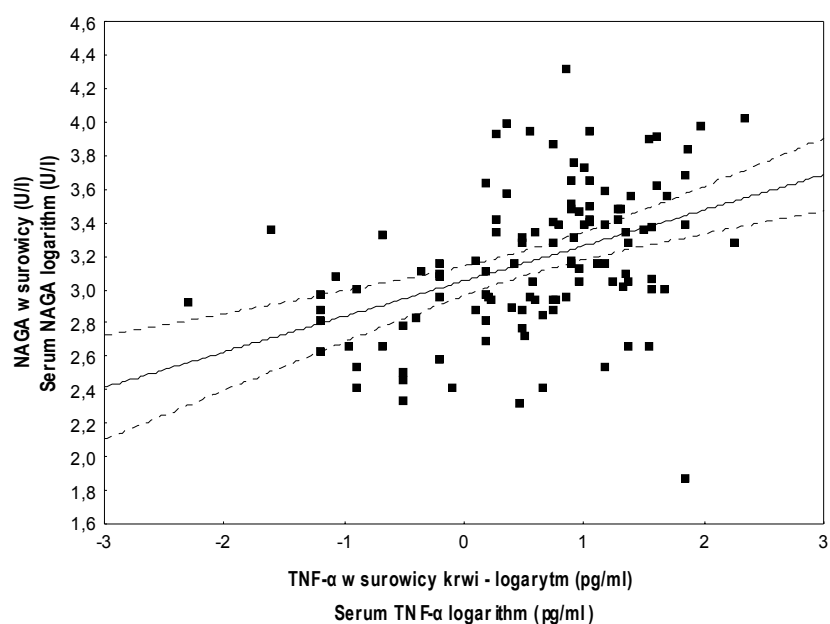
Ryc. 7. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy a aktywnością NAG w surowicy w badanej grupie 1 ($R=0,45$; $p<0,001$).

Fig. 7. Correlation between serum TNF- α and serum NAG activity in the examined group 1 ($R=0.45$; $p<0.001$).



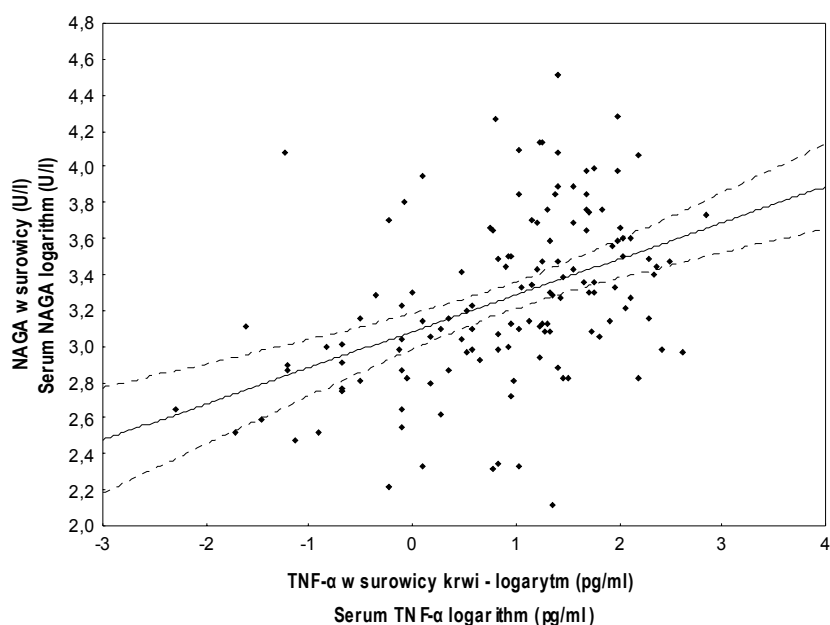
Ryc. 8. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy a aktywnością NAG w surowicy w badanej grupie 2 ($R=0,56$; $p<0,001$).

Fig. 8. Correlation between serum TNF- α and serum NAG activity in the examined group 2 ($R=0.56$; $p<0.001$).



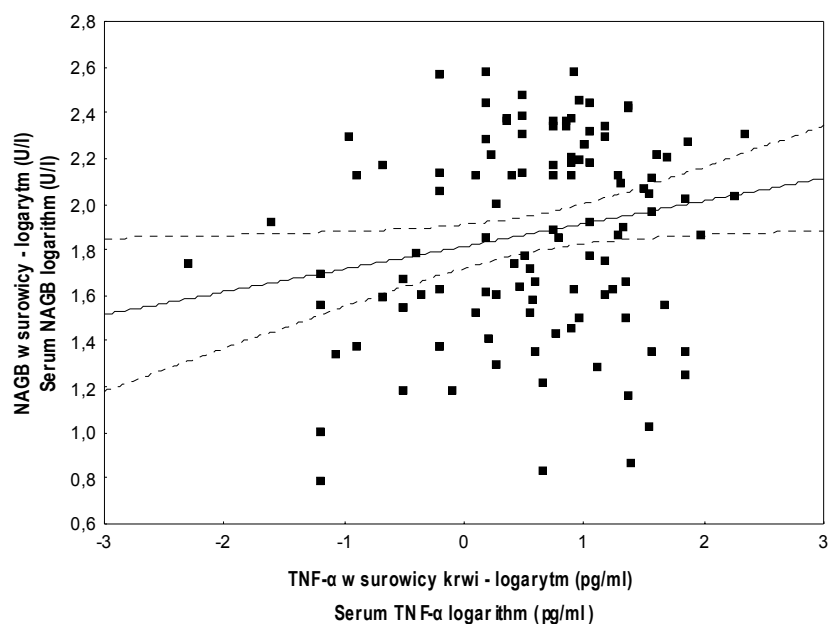
Ryc. 9. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy a aktywnością NAG A w surowicy w badanej grupie 1 ($R=0,44$; $p<0,001$).

Fig. 9. Correlation between serum TNF- α and serum NAG A activity in the examined group 1 ($R=0.44$; $p<0.001$).



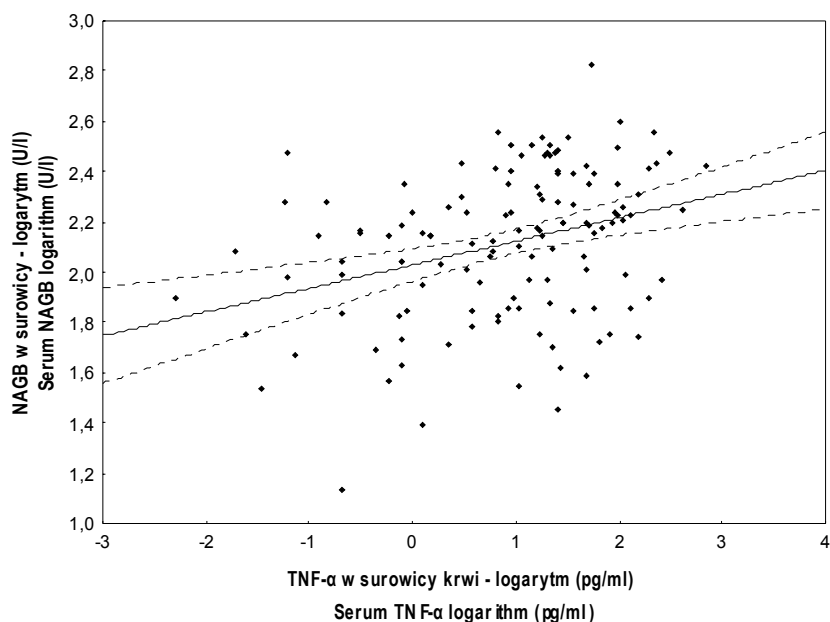
Ryc. 10. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy a aktywnością NAG A w surowicy w badanej grupie 2 ($R=0,56$; $p<0,001$).

Fig. 10. Correlation between serum TNF- α and serum NAG A activity in the examined group 2 ($R=0.56$; $p<0.001$).



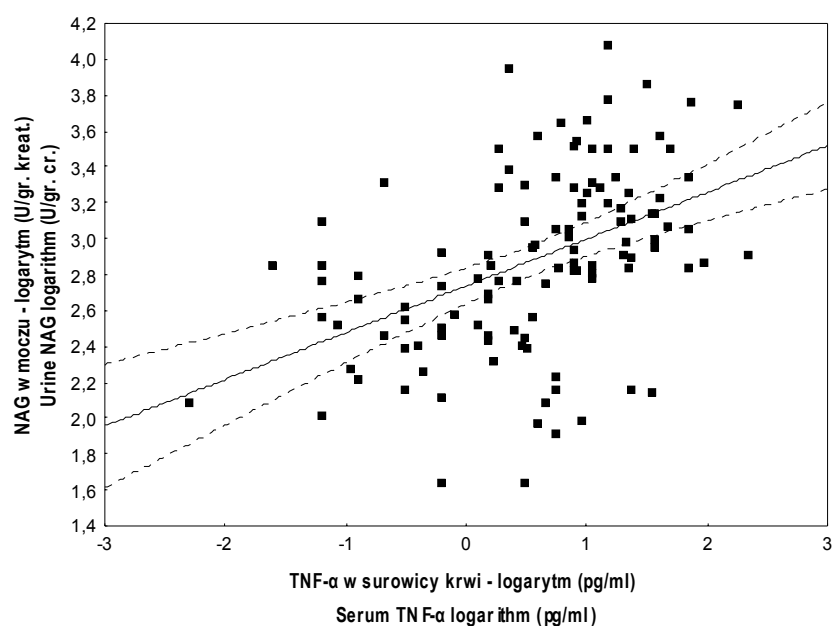
Ryc. 11. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy a aktywnością NAG B w surowicy w badanej grupie 1 ($R=0,21$; $p=0,004$).

Fig. 11. Correlation between serum TNF- α and serum NAG B activity in the examined group 1 ($R=0.21$; $p=0.004$)



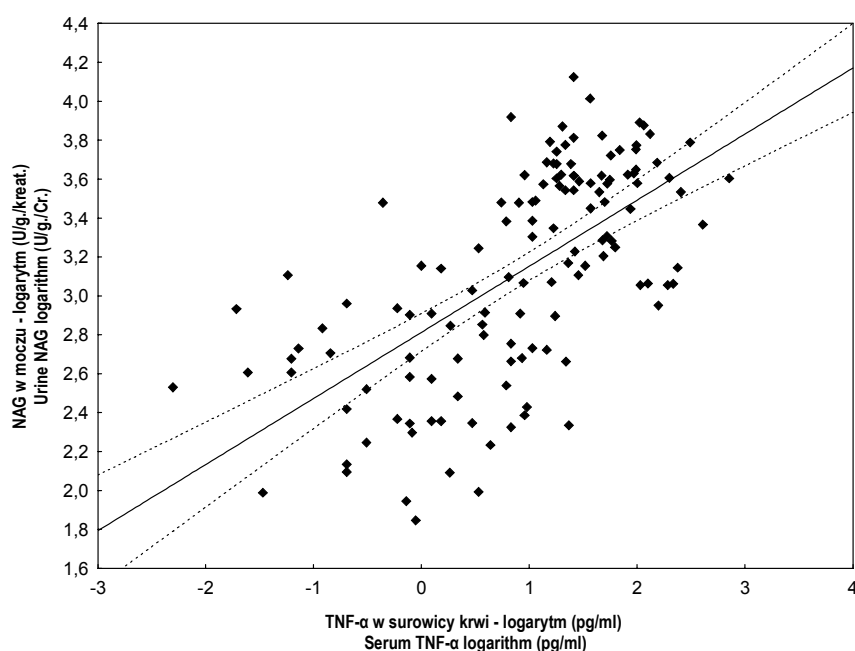
Ryc. 12. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy a aktywnością NAG B w surowicy w badanej grupie 2 ($R=0,34$; $p<0,001$).

Fig. 12. Correlation between serum TNF- α and serum NAG B activity in the examined group 2 ($R=0.34$; $p=0.004$).



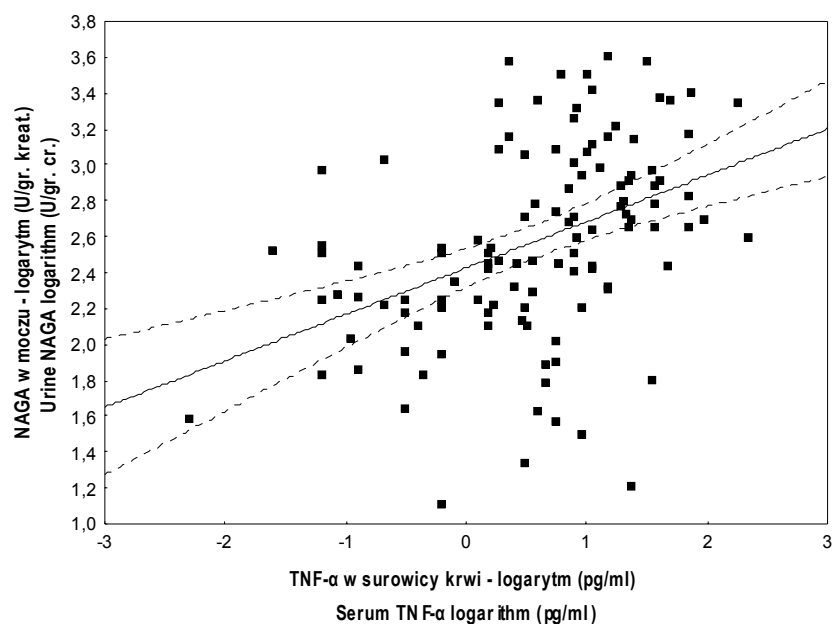
Ryc. 13. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy a aktywnością NAG w moczu w badanej grupie 1 ($R=0,49$; $p<0,001$)

Fig. 13. Correlation between serum TNF- α and urine NAG activity in the examined group 1 ($R=0.49$; $p<0.001$)



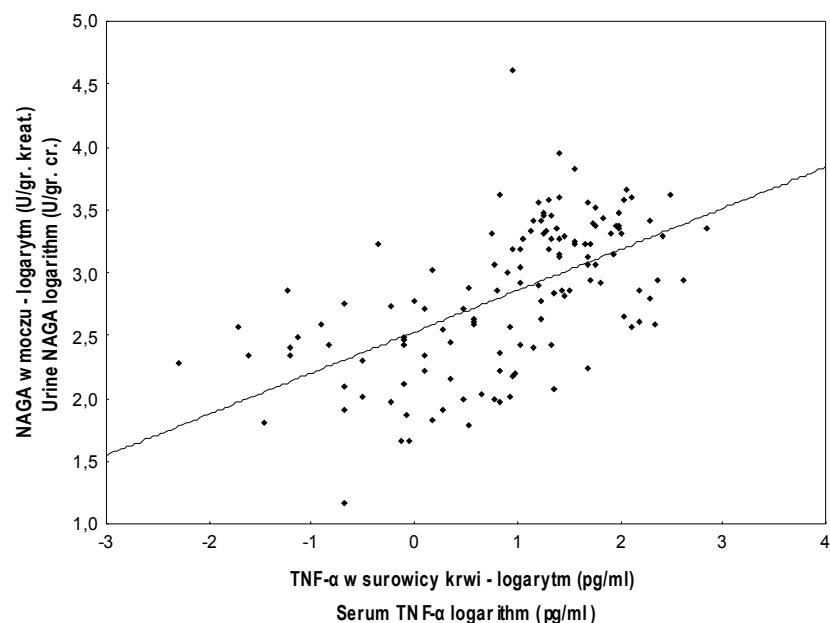
Ryc. 14. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy a aktywnością NAG w moczu w badanej grupie 2 ($R=0,71$; $p<0,001$)

Fig. 14. Correlation between serum TNF- α and urine NAG activity in the examined group 2 ($R=0.71$; $p<0.001$)



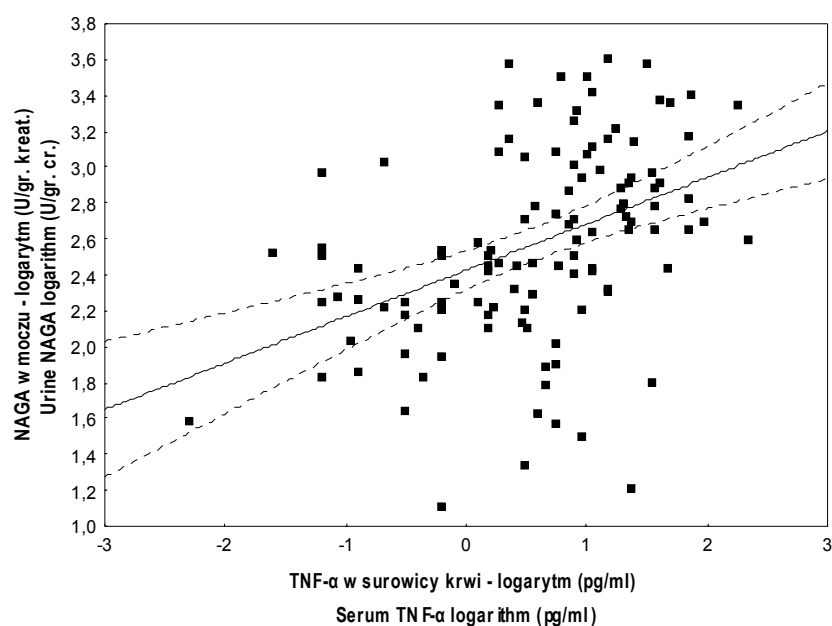
Ryc. 15. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy a aktywnością NAG A w moczu w badanej grupie 1 ($R=0.46$; $p<0.001$)

Fig. 15. Correlation between serum TNF- α and urine NAG activity in the examined group 1 ($R=0.46$; $p<0.001$)



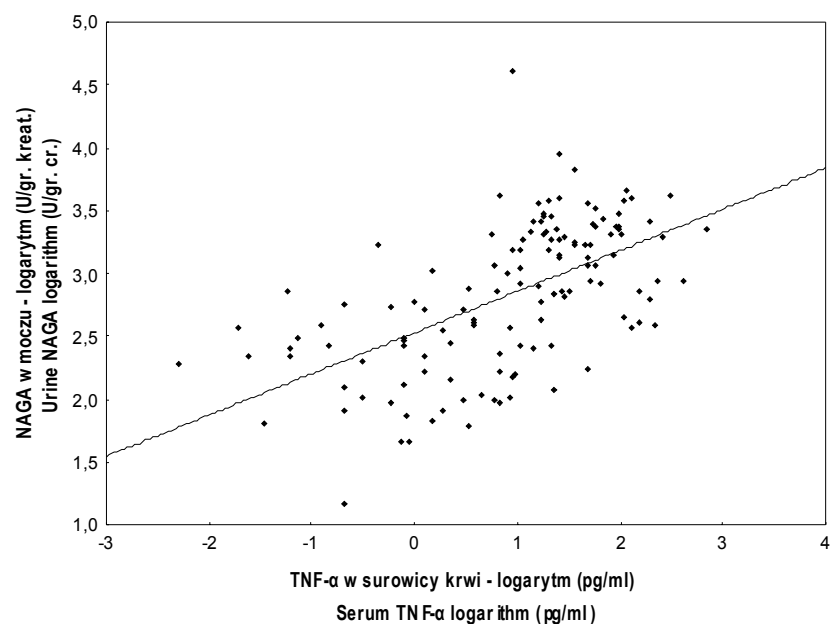
Ryc. 16. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy a aktywnością NAG A w moczu w badanej grupie 2 ($R=0.68$; $p<0.001$)

Fig. 16. Correlation between serum TNF- α and urine NAG activity in the examined group 2 ($R=0.68$; $p<0.001$)



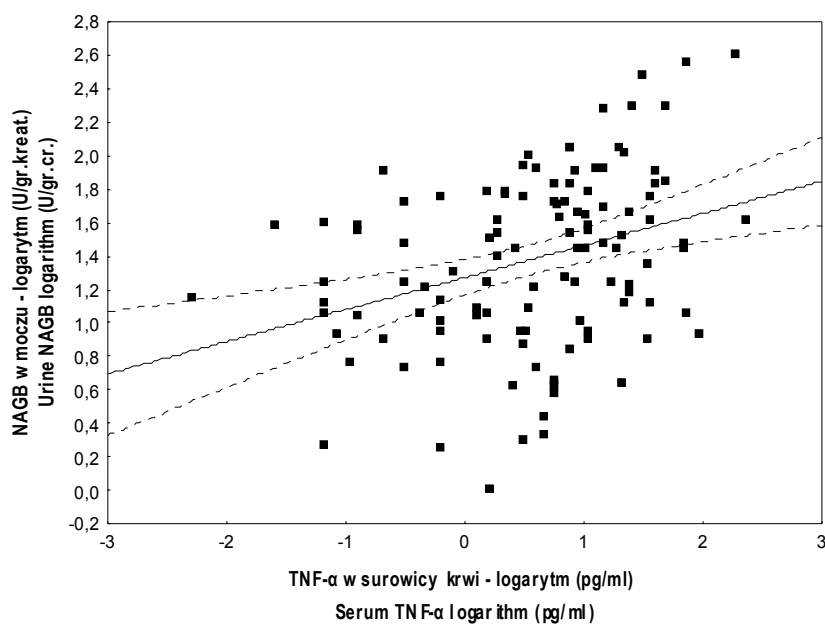
Ryc. 17. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy a aktywnością NAG A w moczu w badanej grupie 1 ($R=0,46$; $p<0,001$).

Fig. 17. Correlation between serum TNF- α and urine NAG activity in the examined group 1 ($R=0.46$; $p<0.001$).



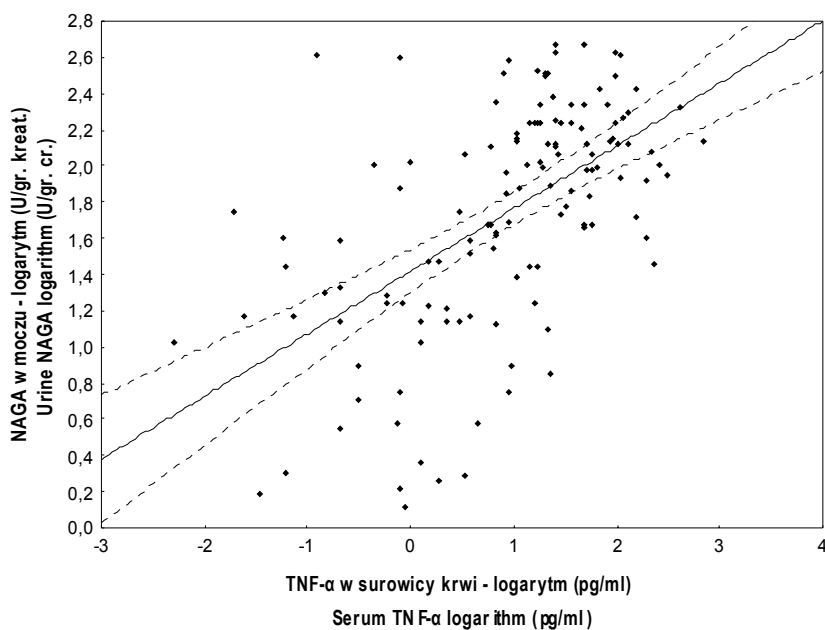
Ryc. 18. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy a aktywnością NAG A w moczu w badanej grupie 2 ($R=0,68$; $p<0,001$).

Fig. 18. Correlation between serum TNF- α and urine NAG activity in the examined group 2 ($R=0.68$; $p<0.001$).



Ryc. 19. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy a aktywnością NAG B w moczu w badanej grupie 1 ($R=0,29$; $p<0,001$).

Fig. 19. Correlation between serum TNF- α and urine NAG activity in the examined group 1 ($R=0.29$; $p<0.001$)



Ryc. 20. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy a aktywnością NAG B w moczu w badanej grupie 2 ($R=0,64$; $p<0,001$).

Fig. 20. Correlation between serum TNF- α and urine NAG B activity in the examined group 2 ($R=0.64$; $p<0.001$)

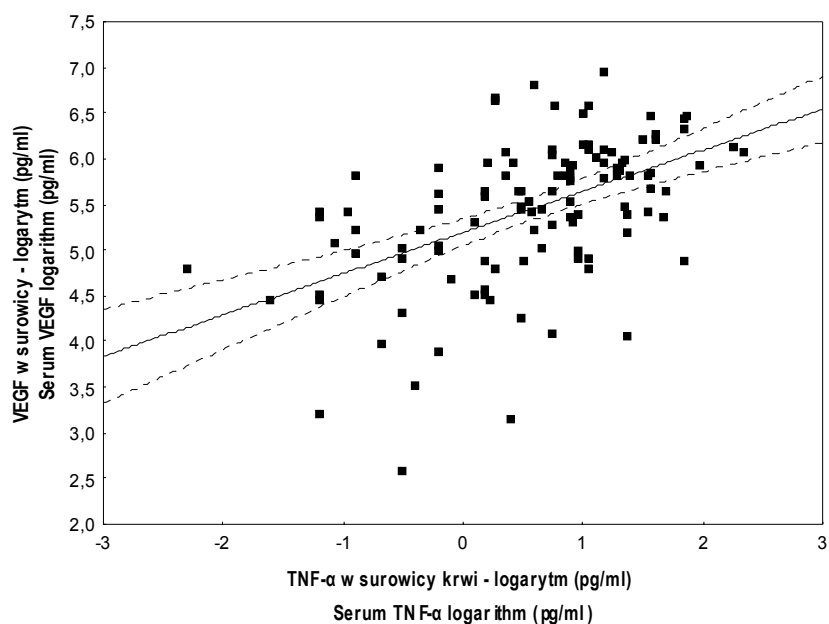
4.10.3. Analiza korelacji TNF- α z parametrami immunologicznymi u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2)

U dzieci z cukrzycą typu 1 zarówno na początku badania (grupa 1) jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2) stwierdzono ujemną statystycznie znaczącą korelację pomiędzy poziomem TNF- α w surowicy krwi a poziomem IL-12 ($R=-0,33$, $p^1<0,001$; $R=-0,45$, $p^2<0,001$), poziomem IL-10 ($R=-0,29$, $p^1<0,001$; $R=-0,48$, $p^2<0,001$) oraz istotną dodatnią korelację pomiędzy poziomem TNF- α a poziomem VEGF ($R=0,54$, $p^1=0,004$; $R=0,71$, $p^2<0,001$) w surowicy krwi. Ponadto wykazano na początku badania istotną korelację pomiędzy TNF- α w surowicy krwi a poziomem IL-6 w surowicy krwi ($R=0,34$, $p^1<0,001$ oraz IL-6 w moczu ($R=0,37$, $p^1<0,001$) (tab. 31, ryc. 21-22).

Tab. 31. Wyniki badań korelacji TNF α z parametrami immunologicznymi w grupie 1 i w grupie 2.

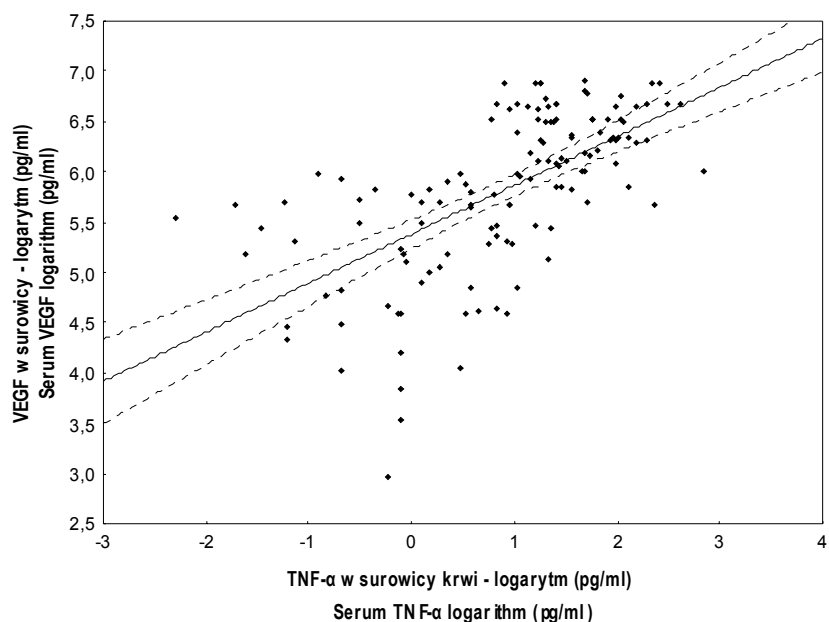
Tab. 31. The results of the correlation analysis between TNF α and immunologic parameters characterizing patients of the group 1 and the group 2 respectively.

TNF- α (pg/ml) surowica / serum Grupa / Group	VEGF (pg/ml) surowica / serum	IL-12 (pg/ml) surowica / serum	IL-10 (pg/ml) surowica / serum
Grupa 1 / Group 1	$R = 0,54$ $p < 0,001$	$R = -0,33$ $p < 0,001$	$R = -0,29$ $p < 0,001$
Grupa 2 / Group 2	$R = 0,71$ $p < 0,001$	$R = -0,45$ $p < 0,001$	$R = -0,48$ $p < 0,001$



Ryc. 21. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α a poziomem VEGF w surowicy w badanej grupie 1 ($R=0,54$; $p<0,001$).

Fig. 21. Correlation between serum TNF- α and serum VEGF levels in the examined group 1 ($R=0.54$; $p<0.001$).



Ryc. 22. Korelacja pomiędzy poziomem TNF- α a poziomem VEGF w surowicy w badanej grupie 2 ($R=0,71$; $p<0,001$).

Fig. 22. Correlation between serum TNF- α and serum VEGF levels in the examined group 2 ($R=0.71$; $p<0.001$).

4.11. ANALIZA KORELACJI IL-6 Z PARAMETRAMI KLINICZNYMI I BIOCHEMICZNYMI I IMMUNOLOGICZNYMI U PACJENTÓW Z CUKRZYCĄ TYPU 1

W grupie dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) stwierdzono dodatnią statystycznie zmienną korelację pomiędzy poziomem IL-6 zarówno w surowicy krwi i w moczu a wiekiem pacjenta ($R=0,17$, $p=0,018$; $R=0,15$, $p=0,039$), czasem trwania choroby ($R=0,27$, $p<0,001$; $R=0,22$, $p=0,002$), poziomem CRP ($R=0,24$, $p=0,001$; $R=0,23$, $p=0,002$), poziomem cystatyny C ($R=0,22$, $p=0,003$; $R=0,20$, $p=0,007$), wielkością wydalania albumin w moczu ($R=0,34$, $p<0,001$; $R=0,34$, $p<0,001$) oraz pomiędzy poziomem IL-6 w surowicy krwi a wielkością ciśnienia skurczowego ($R=0,29$, $p<0,001$) i ciśnienia rozkurczowego ($R=0,21$, $p<0,004$) (tab. 32).

Tab. 32. Wyniki korelacji IL-6 w surowicy krwi i w moczu z parametrami klinicznymi i biochemicznymi w grupie 1.

Tab. 32. The results of the correlation analysis between serum IL-6 levels and clinical and biochemical parameters characterizing patients of the group 1.

IL-6	Czas trwania choroby (lata) <i>Duration of diabetes (years)</i>	CRP (mg/l)	HbA1c (%)	Albuminuria (mg/dobę)	Cystatyna C <i>Cystatin C</i> (mg/l)
surowica / serum (pg/ml)	$R = 0,27$ $p < 0,001$	$R = 0,24$ $p = 0,001$	$R = 0,09$ $p = 0,227$	$R = 0,34$ $p < 0,001$	$R = 0,22$ $p = 0,003$
mocz / urine (pg/g kreat)	$R = 0,22$ $p = 0,002$	$R = 0,23$ $p = 0,002$	$R = 0,19$ $p = 0,058$	$R = 0,29$ $p < 0,001$	$R = 0,20$ $p = 0,007$

4.12. ANALIZA KORELACJI IL-12 Z PARAMETRAMI KLINICZNYMI, BIOCHEMICZNYMI I IMMUNOLOGICZNYMI U PACJENTÓW Z CUKRZYCĄ TYPU 1

4.12.1. Analiza korelacji IL-12 z parametrami klinicznymi i biochemicznymi u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2)

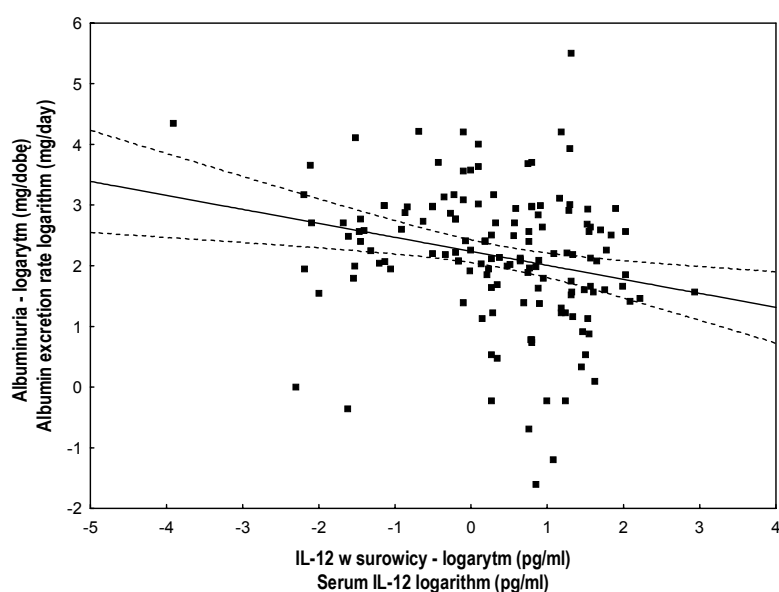
W grupie dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2) stwierdzono ujemną statystycznie zmienną korelację

między poziomem IL-12 w surowicy krwi a wiekiem pacjenta ($R=-0,27$, $p^1<0,001$; $R=-0,26$, $p^2<0,001$), czasem trwania choroby ($R=-0,32$, $p^1<0,001$; $R=-0,31$, $p^2<0,001$), poziomem CRP ($R=-0,28$, $p^1<0,001$; $R=-0,27$, $p^2<0,001$), poziomem cystatyny C ($R=-0,25$, $p^1<0,001$; $R=-0,29$, $p^2<0,001$) oraz wielkością wydalania albumin w moczu ($R=-0,36$, $p^1<0,001$; $R=-0,34$, $p^2<0,001$). Nie wykazano statystycznie znamiennych korelacji pomiędzy poziomem IL-12 a poziomem kreatyniny ($R=-0,09$, $p^1=0,22$) oraz poziomem HbA1c ($R=-0,02$, $p^1=0,789$) u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania, natomiast po 4 latach obserwacji stwierdzono istotne ujemne korelacje pomiędzy badaną cytokiną a poziomem kreatyniny ($R=-0,16$, $p^2=0,029$) oraz poziomem HbA1c ($R=-0,19$, $p^2=0,008$) (tab. 33, ryc. 23 – 26).

Tab. 33. Wyniki korelacji IL-12 w surowicy z parametrami klinicznymi i biochemicznymi w grupie 1 i w grupie 2.

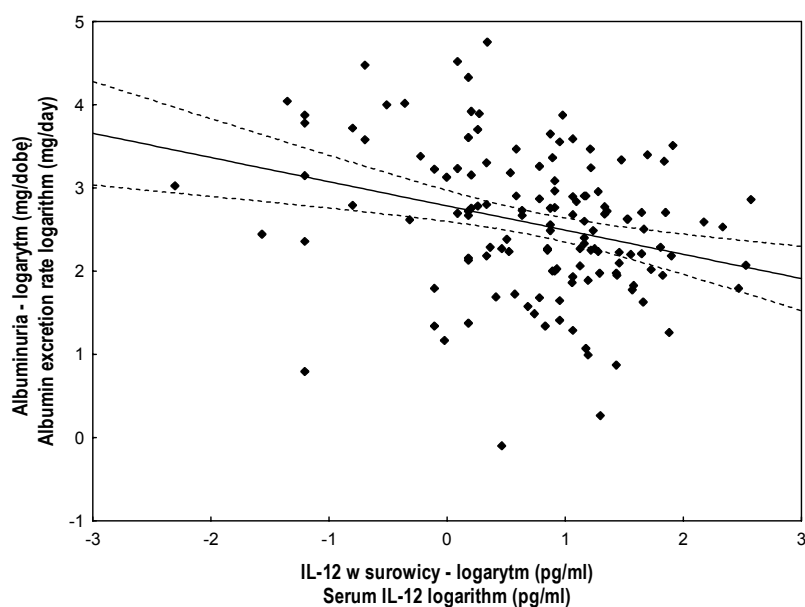
Tab. 33. The results of the correlation analysis between serum IL-12 levels and clinical and biochemical parameters characterizing patients of the Group 1 and the Group 2 respectively.

IL-12 (pg/ml) surowica / serum Grupa / Group	Wiek (lata) Age (years)	Czas trwania choroby (lata) Duration of diabetes (years)	CRP (mg/l)	HbA1c (%)
Grupa 1 / Group 1	$R = -0,27$ $p < 0,001$	$R = -0,32$ $p < 0,001$	$R = -0,28$ $p < 0,001$	$R = -0,02$ $p = 0,789$
Grupa 2 / Group 2	$R = -0,26$ $p < 0,001$	$R = -0,31$ $p < 0,001$	$R = -0,27$ $p < 0,001$	$R = -0,19$ $p = 0,008$



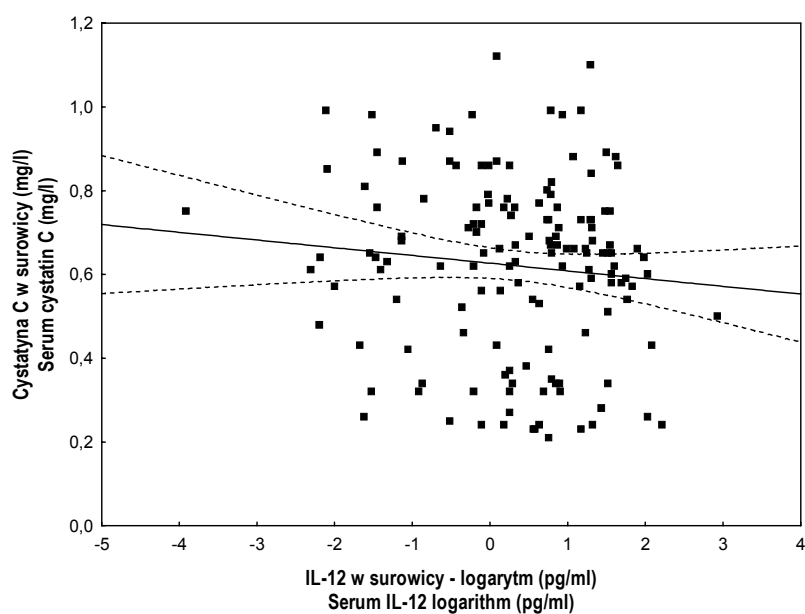
Ryc. 23. Korelacja pomiędzy poziomem IL-12 a dobowym wydalaniem albumin w badanej grupie 1 ($R=-0,36$; $p<0,001$).

Fig. 23. Correlation between serum IL-12 levels and albumin excretion rate in the examined group 1 ($R=-0.36$; $p<0.001$).



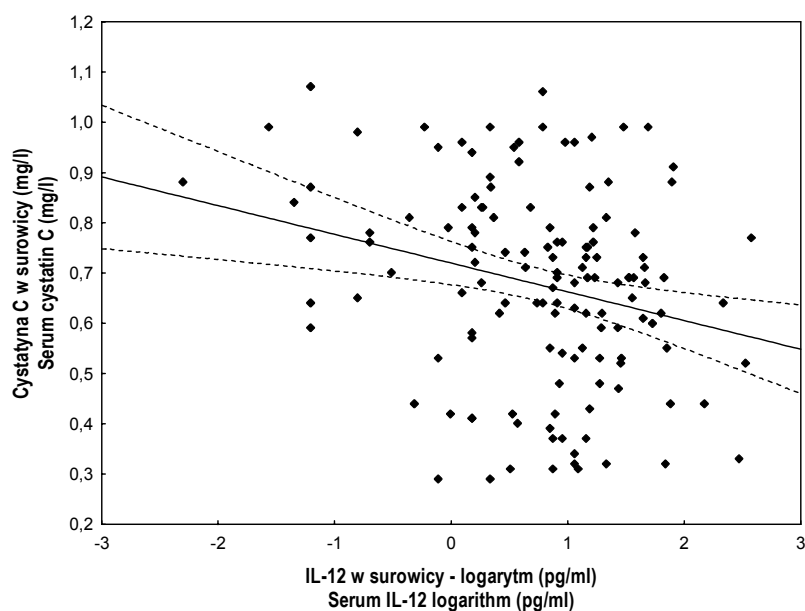
Ryc. 24. Korelacja pomiędzy poziomem IL-12 a dobowym wydalaniem albumin w badanej grupie 2 ($R=-0,34$; $p<0,001$).

Fig. 24. Correlation between serum IL-12 levels and albumin excretion rate in the examined group 2 ($R=-0.34$; $p<0.001$).



Ryc. 25. Korelacja pomiędzy poziomem IL-12 a poziomem cystatyny C w surowicy w badanej grupie 1 ($R = -0.25$; $p < 0.001$).

Fig. 25. Correlation between serum VEGF and serum cystatin C levels in the examined group 1 ($R = -0.25$; $p < 0.001$)



Ryc. 26. Korelacja pomiędzy poziomem IL-12 a poziomem cystatyny C w surowicy w badanej grupie 2 ($R = -0.29$; $p < 0.001$).

Fig. 26. Correlation between serum VEGF and serum cystatin C levels in the examined group 2 ($R = -0.29$; $p < 0.001$)

4.12.2. Analiza korelacji IL-12 z enzymem NAG i jego izoenzymami A i B w surowicy i w moczu u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2)

U dzieci z cukrzycą typu 1 zarówno na początku badania (grupa 1) jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2) stwierdzono ujemną statystycznie znaczącą korelację pomiędzy poziomem IL-12 w surowicy krwi a aktywnością enzymu NAG ($R = -0,16$, $p^1 = 0,026$; $R = -0,26$, $p^2 < 0,001$) i jego izoenzymu A ($R = -0,19$, $p^1 = 0,012$; $R = -0,26$, $p^2 < 0,001$) w surowicy krwi oraz enzymu NAG ($R = -0,32$, $p^1 < 0,001$; $R = 0,45$, $p^2 < 0,001$) i jego izoenzymów A ($R = -0,42$, $p^1 < 0,001$; $R = -0,32$, $p^2 < 0,001$) i B ($R = -0,2$, $p^1 = 0,007$; $R = -0,41$, $p^2 < 0,001$) w moczu. Natomiast nie wykazano istotnych korelacji pomiędzy poziomem IL-12 w surowicy krwi a poziomem izoenzymu B w surowicy krwi zarówno w badanej grupie 1 ($R = -0,06$, $p^1 = 0,39$) jak i 2 ($R = -0,14$, $p^2 = 0,066$) (tab. 34).

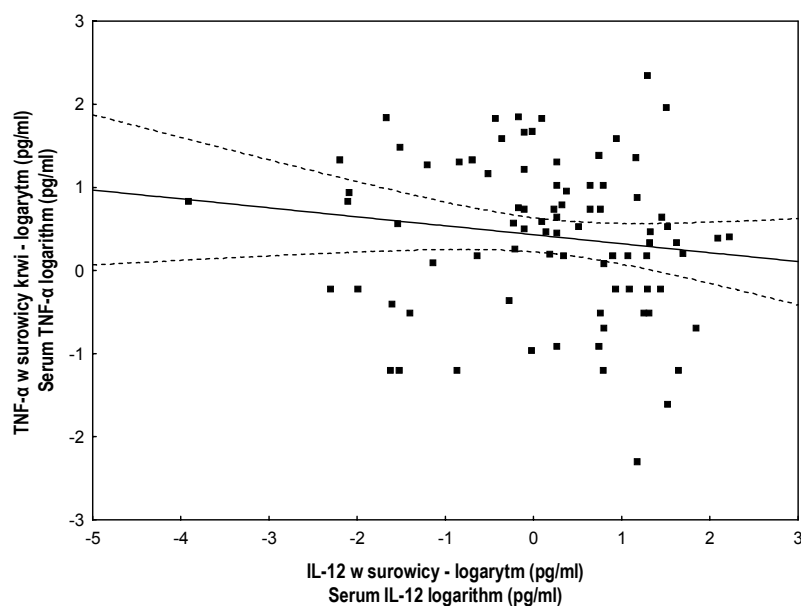
Tab. 34. Wyniki korelacji IL-12 w surowicy z enzymem NAG i jego izoenzymami A i B w surowicy i w moczu w grupie 1 i w grupie 2.

Tab. 34. The results of the correlation analysis between serum IL-12 levels and serum and urine activity of the NAG enzyme and its A and B isoforms measured in patients of the group 1 and the group 2 respectively.

IL-12 (pg/ml) surowica / serum Grupa / Group	NAG (U/l) surowica serum	NAG A (U/l) surowica serum	NAG (U/g krat.) mocz / urine	NAG A (U/g kreat.) mocz / urine	NAG B (U/g kreat.) mocz / urine
Grupa 1 / Group 1	$R = -0,16$ $p = 0,026$	$R = -0,19$ $p = 0,012$	$R = -0,32$ $p < 0,001$	$R = -0,32$ $P < 0,001$	$R = -0,20$ $p = 0,007$
Grupa 2 / Group 2	$R = -0,26$ $p < 0,001$	$R = -0,26$ $p < 0,001$	$R = -0,45$ $p < 0,001$	$R = -0,42$ $p < 0,001$	$R = -0,41$ $p < 0,001$

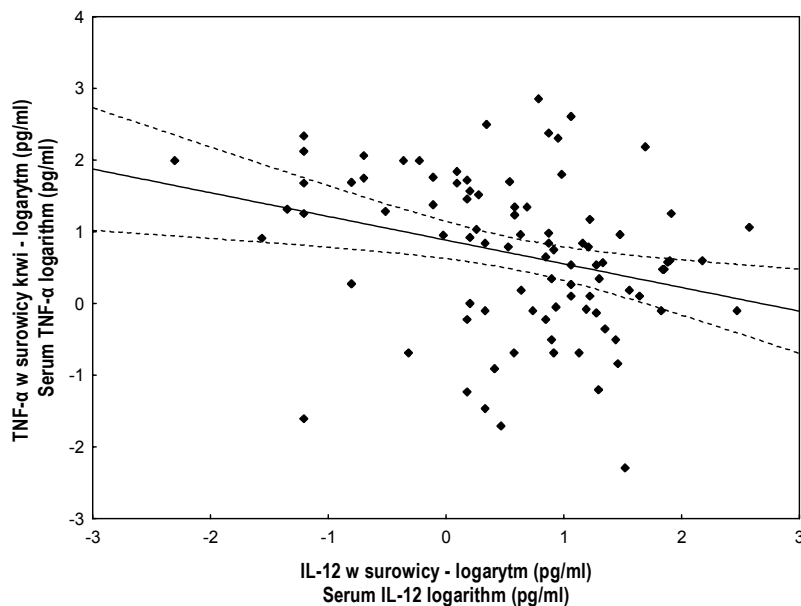
4.12.3. Analiza korelacji IL-12 z parametrami immunologicznymi u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2)

U dzieci z cukrzycą typu 1 zarówno na początku badania (grupa 1) jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2) stwierdzono ujemną statystycznie znaczącą korelację pomiędzy poziomem IL-12 w surowicy krwi a poziomem TNF- α ($R = -0,33$, $p^1 < 0,001$; $R = -0,45$, $p^2 < 0,001$) i poziomem VEGF ($R = -0,29$, $p^1 = 0,001$; $R = -0,46$, $p^2 < 0,001$) w surowicy krwi (ryc. 27-30).



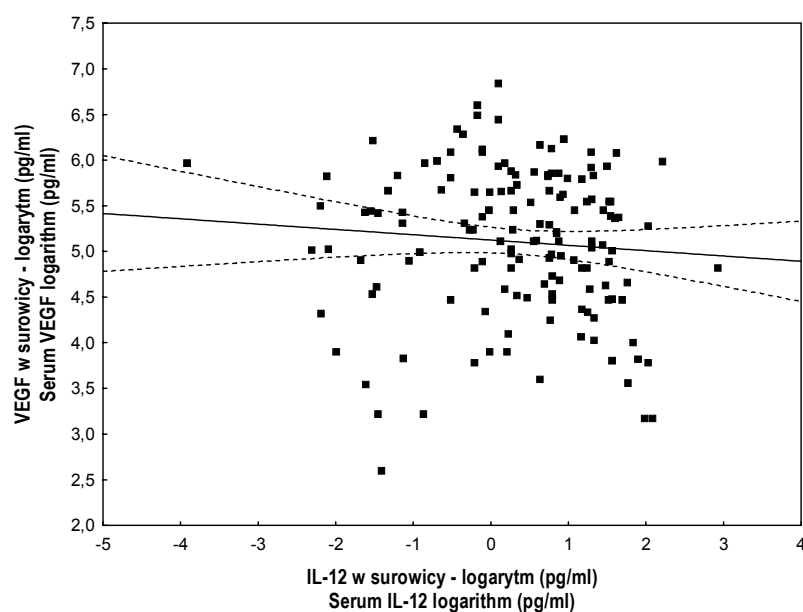
Ryc. 27. Korelacja pomiędzy poziomem IL-12 a TNF- α w surowicy w badanej grupie 1 ($R=-0,33$; $p<0,001$).

Fig. 27. Correlation between serum IL-12 and serum TNF- α levels in the examined group 1 ($R=-0.33$; $p<0.001$).



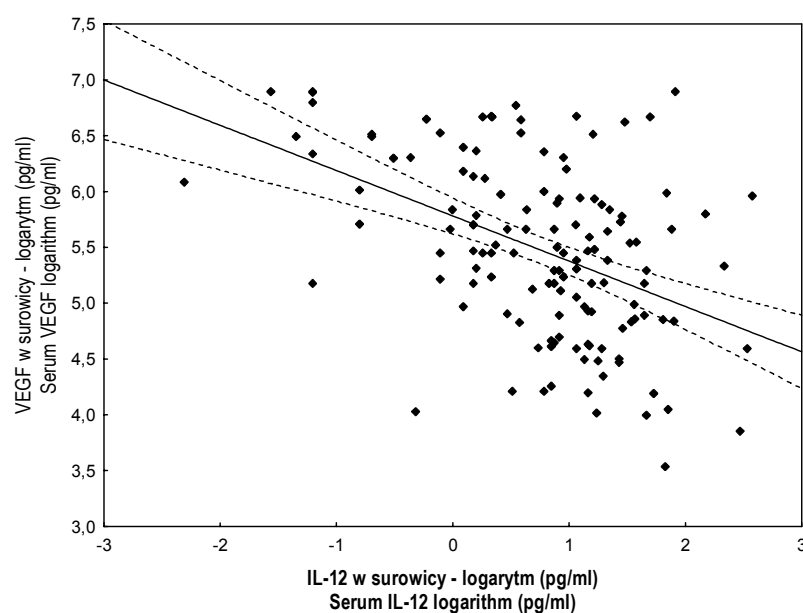
Ryc. 28. Korelacja pomiędzy poziomem IL-12 a TNF- α w surowicy w badanej grupie 2 ($R=-0,45$; $p<0,001$).

Fig. 28. Correlation between serum IL-12 and serum TNF- α levels in the examined group 2 ($R=-0.45$; $p<0.001$).



Ryc. 29. Korelacja pomiędzy poziomem IL-12 a VEGF w surowicy w badanej grupie 1 ($R = -0,29$; $p < 0,001$).

Fig. 29. Correlation between serum IL-12 and serum VEGF levels in the examined group 1 ($R = -0.29$; $p < 0.001$).



Ryc. 30. Korelacja pomiędzy poziomem IL-12 a VEGF w surowicy w badanej grupie 2 ($R = -0,46$; $p < 0,001$).

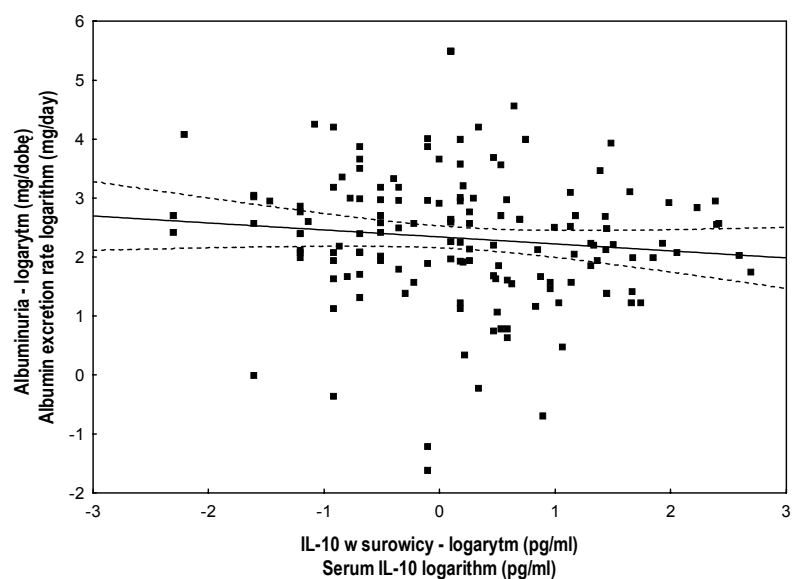
Fig. 30. Correlation between serum IL-12 and serum VEGF levels in the examined group 2 ($R = -0.46$; $p < 0.001$).

Natomiast nie stwierdzono istotnych korelacji pomiędzy poziomem IL-12 a poziomem IL-6 zarówno w surowicy krwi ($R = -0,14$, $p^1 = -0,065$) jak i w moczu ($R = -0,08$, $p^1 = 0,279$) (ryc. 27 – 30).

4.13. ANALIZA KORELACJI IL-10 Z PARAMETRAMI KLINICZNYMI, BIOCHEMICZNYMI I IMUNOLOGICZNYMI U PACJENTÓW Z CUKRZYCĄ TYPU 1

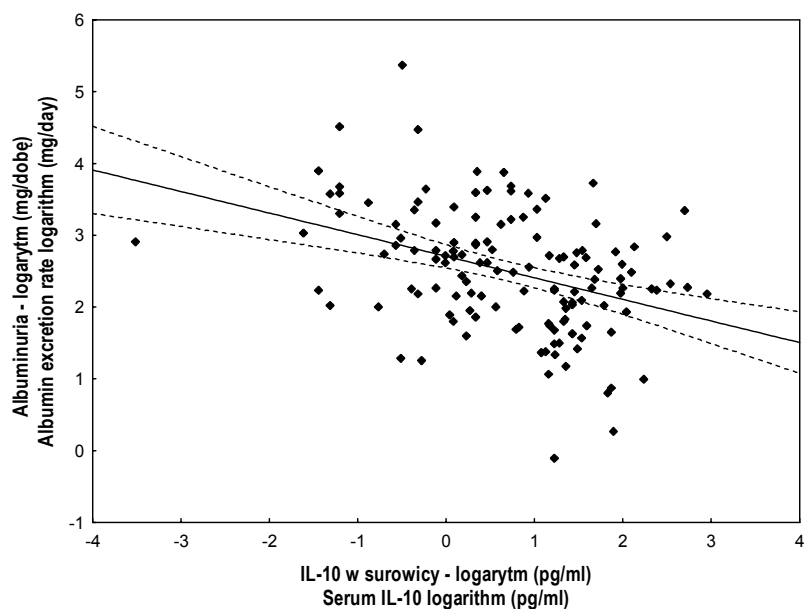
4.13.1. Analiza korelacji IL-10 z parametrami klinicznymi i biochemicznymi u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2)

W grupie dzieci z cukrzycą typu 1 zarówno na początku badania (grupa 1) jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2) stwierdzono ujemną statystycznie znamioną korelację pomiędzy poziomem IL-10 w surowicy krwi a czasem trwania choroby ($R = -0,15$, $p^1 = 0,038$; $R = -0,23$, $p^2 < 0,001$), poziomem CRP ($R = -0,16$, $p^1 = 0,033$; $R = -0,44$, $p^2 < 0,001$) oraz poziomem HbA1c ($R = -0,019$, $p^1 = 0,009$; $R = -0,41$, $p^2 < 0,001$); $R = -0,34$, $p^2 < 0,001$). Nie wykazano statystycznie znamionnych korelacji pomiędzy poziomem IL-10 a wielkością wydalania albumin w moczu, poziomem kreatyniny, poziomem cystatyny C oraz wielkością ciśnienia skurczowego i rozkurczowego u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania, natomiast **po 4 latach obserwacji stwierdzono istotne ujemne korelacje pomiędzy IL-10 a wielkością wydalania albumin w moczu** ($R = -0,47$, $p^2 < 0,001$), **poziomem kreatyniny** ($R = -0,34$, $p^2 < 0,001$), **poziomem cystatyny C** ($R = -0,35$, $p^2 < 0,001$), **oraz wielkością ciśnienia skurczowego** ($R = -0,2$, $p^2 = 0,006$) i **rozkurczowego** ($R = -0,21$, $p^2 = 0,005$) (ryc. 31 – 34, tab. 35).



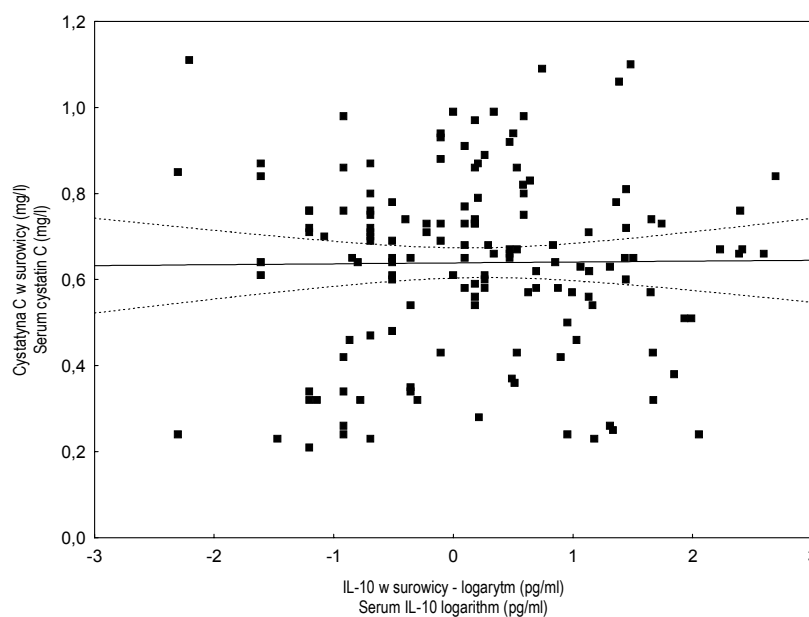
Ryc. 31. Korelacja pomiędzy poziomem IL-10 a dobowym wydalaniem albumin w badanej grupie 1 ($R=-0,11$; $p=0,125$).

Fig. 31. Correlation between serum IL-10 levels and albumin excretion rate in the examined group 1 ($R=-0.11$; $p=0.125$).



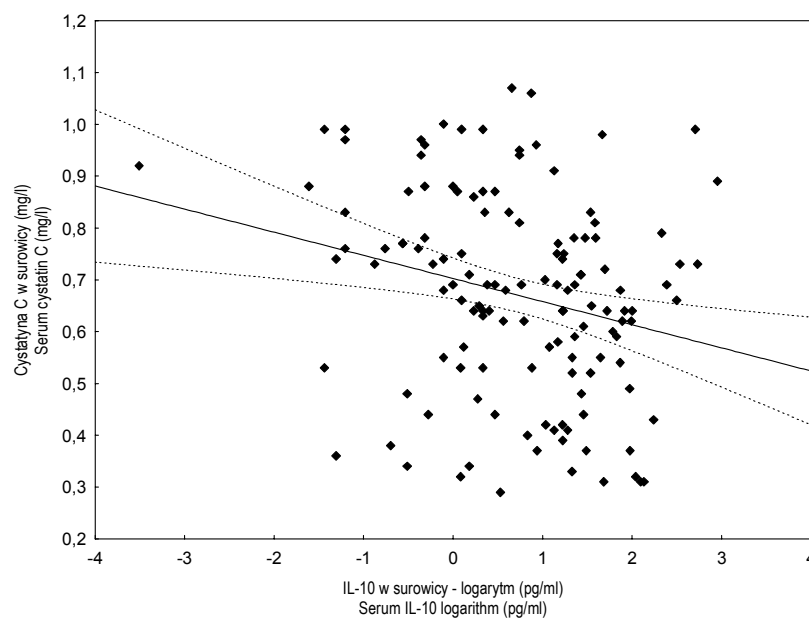
Ryc. 32. Korelacja pomiędzy poziomem IL-10 a dobowym wydalaniem albumin w badanej grupie 2 ($R=-0,47$; $p<0,001$).

Fig. 32. Correlation between serum IL-10 levels and albumin excretion rate in the examined group 2 ($R=-0.47$; $p<0.001$).



Ryc. 33. Korelacja pomiędzy poziomem IL-10 a poziomem cystatyny C w surowicy w badanej grupie 1 ($R=-0,10$; $p=0,166$).

Fig. 33. Correlation between serum IL-10 and serum cystatin C levels in the examined group 1 ($R=-0.10$; $p=0.166$).



Ryc. 34. Korelacja pomiędzy poziomem IL-10 a poziomem cystatyny C w surowicy w badanej grupie 2 ($R=-0,35$; $p<0,001$).

Fig. 34. Correlation between serum IL-10 and serum cystatin C levels in the examined group 2 ($R=-0.35$; $p<0.001$).

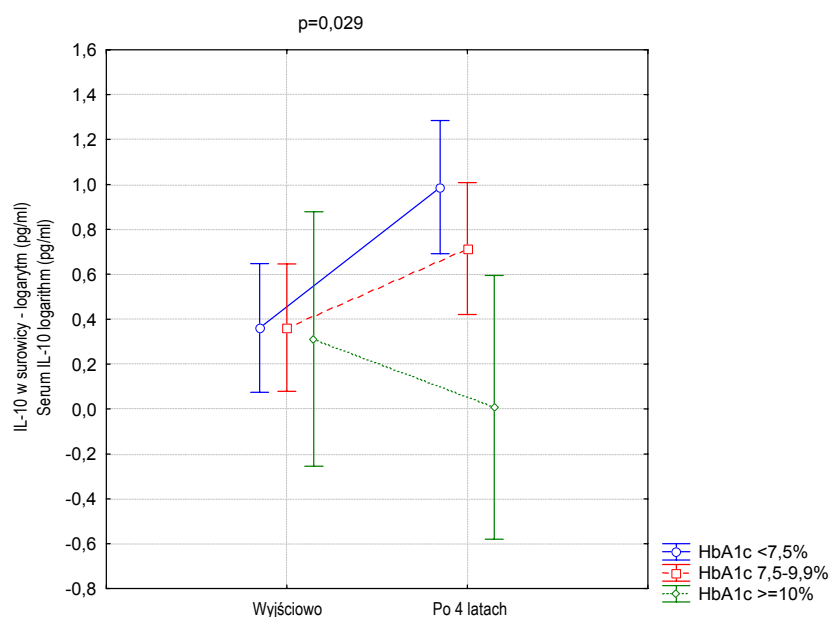
Tab. 35. Wyniki korelacji IL-10 w surowicy z parametrami klinicznymi i biochemicznymi w grupie 1 i grupie 2.

Tab. 35. The results of the correlation analysis between serum IL-10 levels and clinical and biochemical parameters characterizing patients of the group 1 and the group 2 respectively.

IL-10 (pg/ml) surowica / serum Grupa / Group	Wiek (lata) Age (years)	Czas trwania choroby (lata) Duration of diabetes (years)	CRP (mg/l)	HbA1c (%)
Grupa 1 / Group 1	R = -0,13 p = 0,086	R = -0,15 p = 0,038	R = -0,16 p = 0,033	R = -0,19 p = 0,009
Grupa 2 / Group 2	R = -0,29 p < 0,000	R = -0,23 p < 0,001	R = -0,44 p < 0,001	R = -0,41 p < 0,001

4.13.2. Analiza zależność pomiędzy poziomem IL-10 a stopniem wyrównania metabolicznego dzieci chorych na cukrzycę typu 1

W grupie badanych dzieci z cukrzycą typu 1 niewyrównanych metabolicznie z poziomem HbA1c powyżej 10%, stwierdzono statystycznie znamienne niższy poziom IL-10 w porównaniu z grupą pacjentów z poziomem HbA1c poniżej 10% ($p=0,029$). Ponadto **wykazano w trakcie 4-letniej obserwacji, iż najwyższy poziom IL-10 był w grupie chorych z poziomem HbA1c poniżej 7,5%** (ryc. 35).



Ryc. 35. Zależność pomiędzy poziomem IL-10 a HbA1c.

Fig. 35. Relationship between the level of IL-10 and HbA1c.

4.13.3. Analiza korelacji IL-10 z enzymem NAG i jego izoenzymami A i B w surowicy i w moczu u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2)

U dzieci z cukrzycą typu 1 zarówno na początku badania (grupa 1) jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2) stwierdzono ujemną statystycznie znaczącą korelację pomiędzy poziomem IL-10 w surowicy krwi a aktywnością enzymu NAG ($R = -0,23$, $p^1 = 0,002$; $R = -0,41$, $p^2 < 0,001$) i jego izoenzymu A ($R = -0,29$, $p^1 < 0,001$; $R = -0,39$, $p^2 < 0,001$) w surowicy krwi oraz enzymu NAG ($R = -0,26$, $p^1 < 0,001$; $R = 0,49$, $p^2 < 0,001$) i jego izoenzymu A ($R = -0,22$, $p^1 = 0,003$; $R = -0,5$, $p^2 < 0,001$) w moczu. Wykazano ponadto w grupie 2 istotną ujemną korelację pomiędzy poziomem IL-10 a aktywnością izoenzymu B w moczu ($R = -0,45$, $p^2 < 0,001$) Natomiast nie wykazano istotnych korelacji pomiędzy poziomem IL-10 a poziomem izoenzymu B w surowicy krwi i w moczu w badanej grupie 1 (tab. 36).

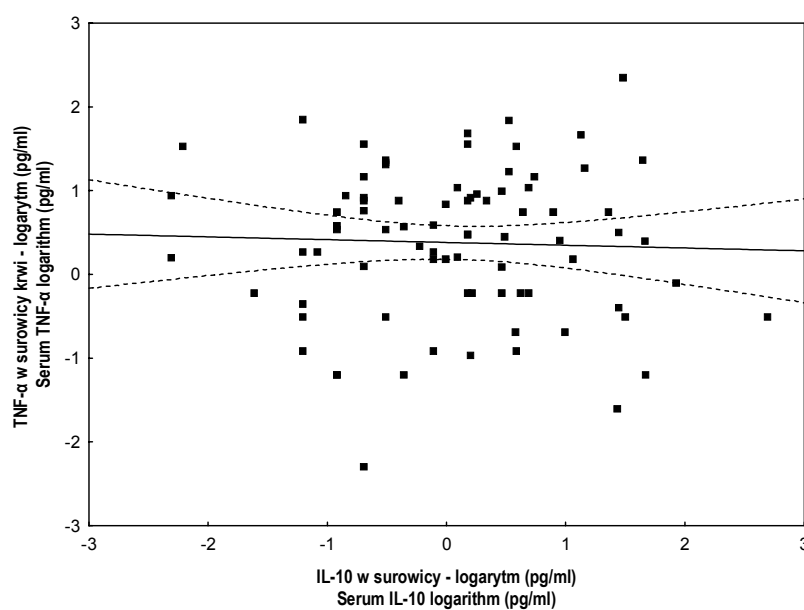
Tab. 36. Wyniki korelacji IL-10 w surowicy z enzymem NAG i jego izoenzymami A i B w surowicy i w moczu w grupie 1 i 2.

Tab. 36. The results of the correlation analysis between serum IL-10 levels and serum and urine activity of the NAG enzyme and its A and B isoforms measured in patients of the group 1 and the group 2 respectively.

IL-10 (pg/ml) surowica / serum	NAG (U/l) surowica / serum	NAG A (U/l) surowica / serum	NAG (U/g. kreat.) mocz / urine	NAG A (U/g.kreat.) mocz / urine
Grupa 1 / Group 1	$R = -0,23$ $p = 0,002$	$R = -0,29$ $p < 0,001$	$R = -0,26$ $p < 0,001$	$R = -0,22$ $p = 0,003$
Grupa 2 / Group 2	$R = -0,41$ $p < 0,001$	$R = -0,39$ $p < 0,001$	$R = -0,49$ $p < 0,001$	$R = -0,50$ $p < 0,001$

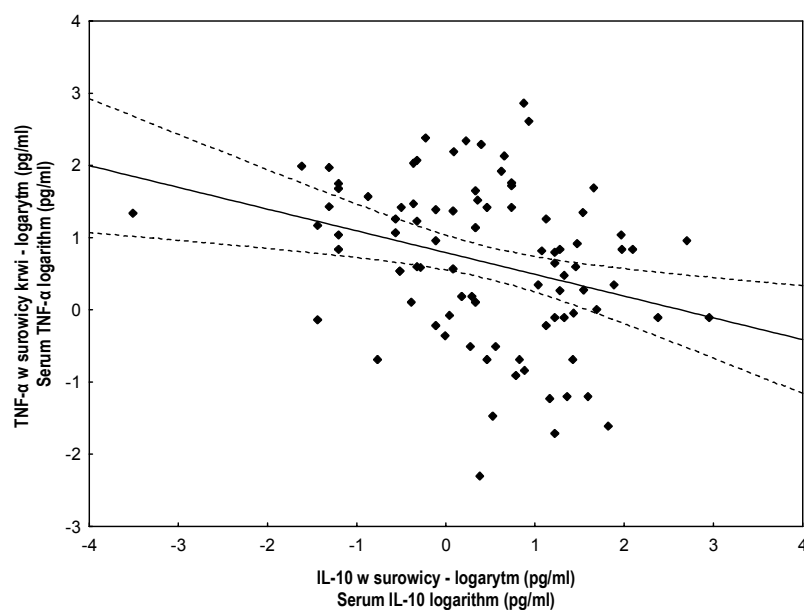
4.13.4. Analiza korelacji IL-10 z parametrami immunologicznymi u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2)

U dzieci z cukrzycą typu 1 zarówno na początku badania (grupa 1) jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2) stwierdzono ujemną statystycznie znaczącą korelację pomiędzy poziomem IL-10 w surowicy krwi a poziomem TNF- α ($R = -0,29$, $p^1 < 0,001$; $R = -0,48$, $p^2 < 0,001$) i poziomem VEGF ($R = -0,35$, $p^1 < 0,001$; $R = -0,49$, $p^2 < 0,001$) w surowicy krwi (ryc. 36-39).



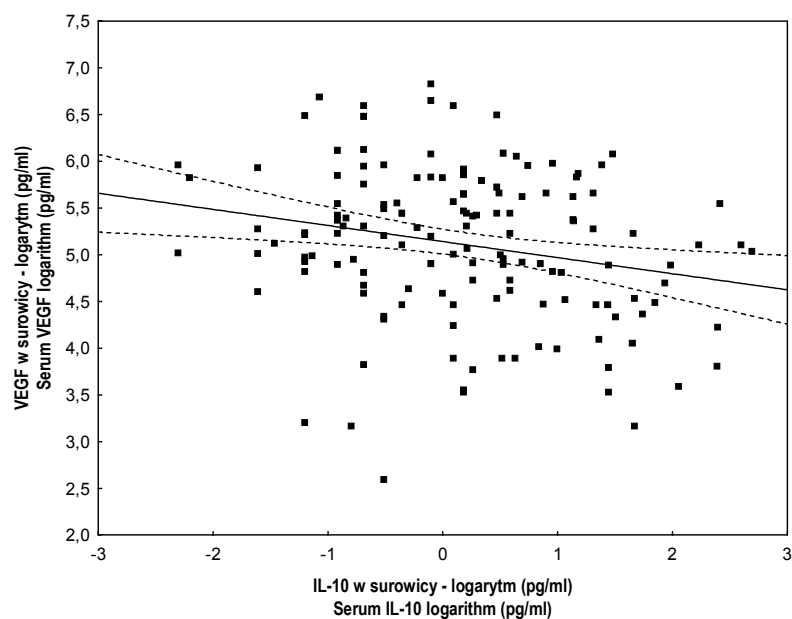
Ryc. 36. Korelacja pomiędzy poziomem IL-10 a poziomem TNF- α w surowicy w badanej grupie 1 ($R=-0,29$; $p<0,001$).

Fig. 36. Correlation between serum IL-10 and serum TNF- α levels in the examined group 1 ($R=-0.29$; $p<0.001$).



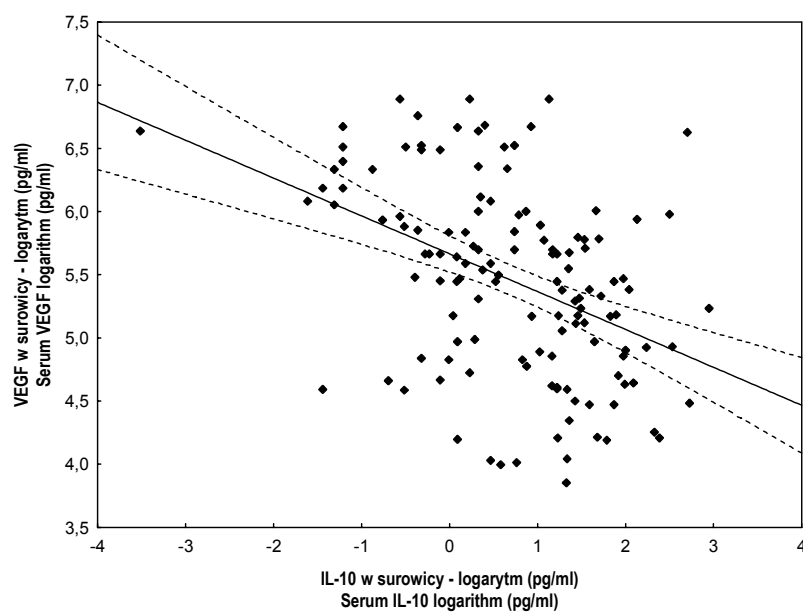
Ryc. 37. Korelacja pomiędzy poziomem IL-10 a poziomem TNF- α w surowicy w badanej grupie 2 ($R=-0,48$; $p<0,001$).

Fig. 37. Correlation between serum IL-10 and serum TNF- α levels in the examined group 2 ($R=-0.48$; $p<0.001$).



Ryc. 38. Korelacja pomiędzy poziomem IL-10 a VEGF w surowicy w badanej grupie 1 ($R=-0,35$; $p<0,001$).

Fig. 38. Correlation between serum IL-10 and serum VEGF levels in the examined group 1 ($R=-0.35$; $p<0.001$)



Ryc. 39. Korelacja pomiędzy poziomem IL-10 a VEGF w surowicy w badanej grupie 2 ($R=-0,49$; $p<0,001$).

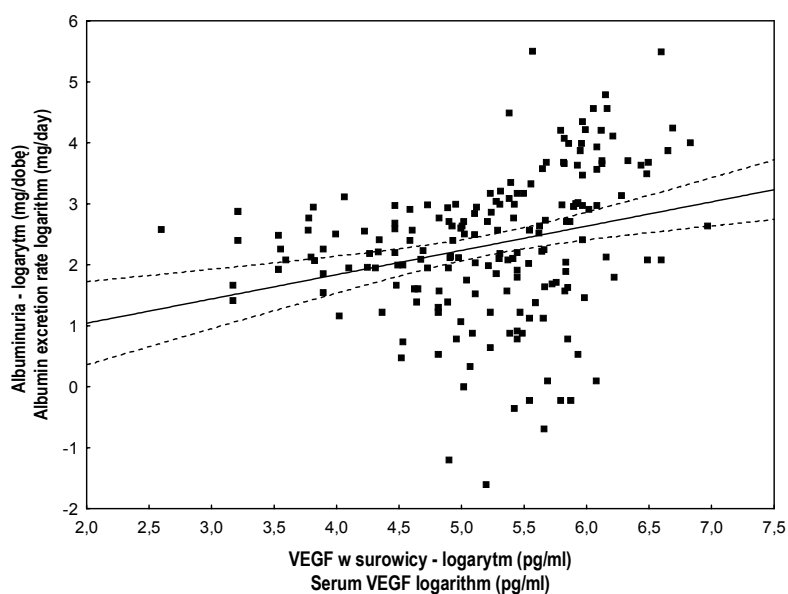
Fig. 39. Correlation between serum IL-10 and serum VEGF levels in the examined group 2 ($R=-0.49$; $p<0.001$)

Ponadto nie stwierdzono w grupie 1 istotnej korelacji pomiędzy poziomem IL-10 a poziomem IL-6 w surowicy krwi, natomiast na początku badania wykazano istotną ujemną korelację poziomu IL-10 a poziomem IL-6 w moczu. ($R = -0,22$, $p = 0,003$) (ryc. 36 – 39).

4.14. ANALIZA KORELACJI VEGF Z PARAMETRAMI KLINICZNYMI I BIOCHEMICZNYMI I IMMUNOLOGICZNYMI U PACJENTÓW Z CUKRZYCĄ TYPU 1

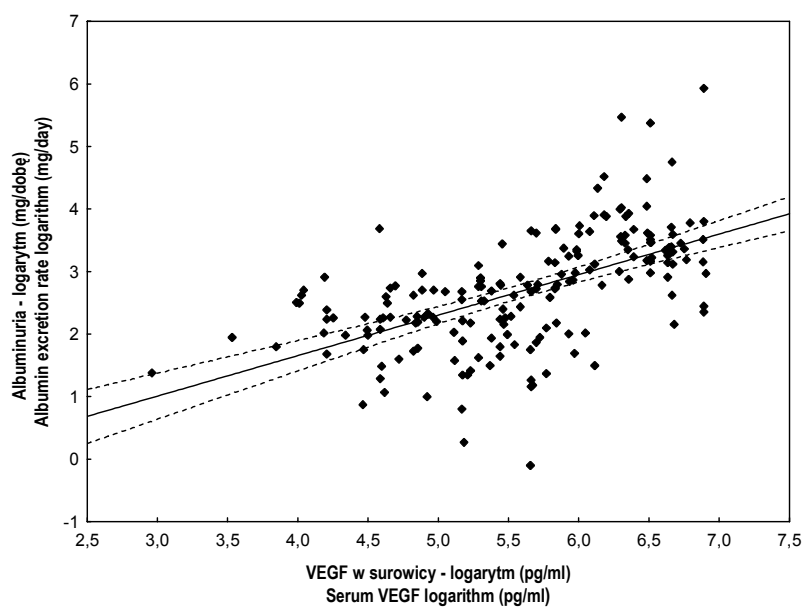
4.14.1. Analiza korelacji VEGF z parametrami klinicznymi i biochemicznymi u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2)

W grupie dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2) stwierdzono dodatnią statystycznie zmienną korelację pomiędzy poziomem VEGF w surowicy krwi a wiekiem pacjenta ($R = 0,18$, $p = 0,014$; $R = 0,28$, $p^2 < 0,001$), czasem trwania choroby ($R = 0,31$, $p^1 < 0,001$; $R = 0,40$, $p^2 < 0,001$), poziomem CRP ($R = 0,32$, $p^1 < 0,001$; $R = 0,55$, $p^2 < 0,001$), poziomem HbA1c ($R = 0,020$, $p^1 = 0,007$; $R = 0,48$, $p^2 < 0,001$), poziomem cystatyny C ($R = 0,36$, $p^1 < 0,001$; $R = 0,57$, $p^2 < 0,001$), wielkością wydalania albumin w moczu ($R = 0,35$, $p^1 < 0,001$; $R = 0,65$, $p^2 < 0,001$) oraz wielkością ciśnienia skurczowego ($R = 0,22$, $p^1 = 0,002$) i rozkurczowego ($R = 0,33$, $p^2 < 0,001$). Nie wykazano statystycznie znamiennej korelacji pomiędzy poziomem VEGF a poziomem kreatyniny u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania, natomiast po 4 latach obserwacji stwierdzono istotną dodatnią korelację pomiędzy badaną cytokiną a poziomem kreatyniny w surowicy krwi ($R = 0,22$, $p^2 = 0,002$) (ryc. 40 – 43, tab.37).



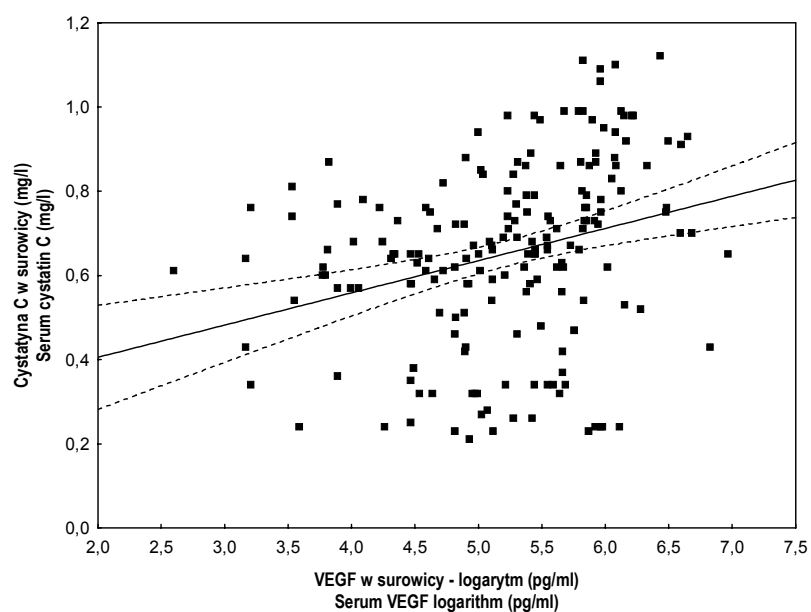
Ryc. 40. Korelacja pomiędzy poziomem VEGF a dobowym wydalaniem albumin w badanej grupie 1 ($R=0,35$; $p<0,001$).

Fig. 40. Correlation between serum VEGF levels and albumin excretion rate in the examined group 1 ($R=0.35$; $p<0.001$).



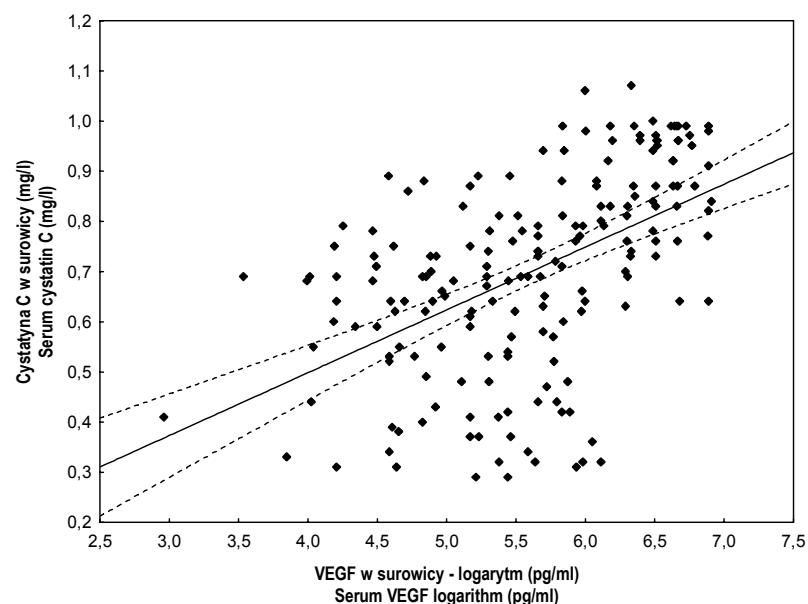
Ryc. 41. Korelacja pomiędzy poziomem VEGF a dobowym wydalaniem albumin w badanej grupie 2 ($R=0,65$; $p<0,001$).

Fig. 41. Correlation between serum VEGF levels and albumin excretion rate in the examined group 2 ($R=0.65$; $p<0.001$).



Ryc. 42. Korelacja pomiędzy poziomem VEGF a poziomem cystatyny C w surowicy w badanej grupie 1 ($R=0,36$; $p<0,001$).

Fig. 42. Correlation between serum VEGF and serum cystatin C levels in the examined group 1 ($R=0.36$; $p<0.001$)



Ryc. 43. Korelacja pomiędzy poziomem VEGF a poziomem cystatyny C w surowicy w badanej grupie 2 ($R=0,57$; $p<0,001$).

Fig. 43. Correlation between serum VEGF and serum cystatin C levels in the examined group 2 ($R=0.57$; $p<0.001$)

Tab. 37. Wyniki korelacji VEGF w surowicy z parametrami klinicznymi i biochemicznymi w grupie 1 i 2.

Tab. 37. The results of the correlation analysis between serum VEGF levels and clinical and biochemical parameters characterizing patients of the group 1 and the group 2 respectively.

VEGF (pg/ml) surowica / serum	Wiek (lata) Age (years)	Czas trwania choroby (lata) Duration of diabetes (years)	CRP (mg/l)	HbA1c (%)
Grupa 1 / Group 1	R = 0,18 p = 0,014	R = 0,31 p < 0,001	R = 0,32 p < 0,001	R = 0,20 p = 0,007
Grupa 2 / Group 2	R = 0,28 p < 0,001	R = 0,40 p < 0,001	R = 0,55 p < 0,001	R = 0,48 p < 0,001

4.14.2. Analiza korelacji VEGF z enzymem NAG i jego izoenzymami A i B w surowicy i w moczu u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) i po 4 latach obserwacji (grupa 2)

U dzieci z cukrzycą typu 1 zarówno na początku badania (grupa 1) jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2) stwierdzono dodatnią statystycznie znaczącą korelację pomiędzy poziomem VEGF w surowicy krwi a aktywnością enzymu NAG ($R=0,40$, $p^1<0,001$; $R=0,56$, $p^2<0,001$), i jego izoenzymów A ($R=0,44$, $p^1<0,001$; $R=0,56$, $p^2<0,001$) i B ($R=0,15$, $p^1=0,043$; $R=0,32$, $p^2<0,001$) w surowicy krwi oraz enzymu NAG ($R=0,58$, $p^1<0,001$; $R=0,78$, $p^2<0,001$) i jego izoenzymów A ($R=0,54$, $p^1<0,001$; $R=0,75$, $p^2<0,001$) i B ($R=0,42$, $p^1<0,001$; $R=0,72$, $p^2<0,001$) w moczu (tab. 38).

Tab. 38. Wyniki korelacji VEGF w surowicy z enzymem NAG i jego izoenzymami A i B w surowicy i w moczu w grupie 1 i 2.

Tab. 38. The results of the correlation analysis between serum VEGF levels and serum and urine activity of the NAG enzyme and its A and B isoforms measured in patients of the group 1 and the group 2 respectively.

VEGF (pg/ml) surowica / serum	NAG (U/l) surowica serum	NAG A (U/l) surowica serum	NAG (U/g. kreat.) mocz / urine	NAG A (U/g. kreat.) mocz / urine	NAG B (U/g.kreat.) mocz / urine
Grupa 1/ Group 1	R = 0,40 p < 0,001	R = 0,44 P < 0,001	R = 0,58 p < 0,001	R = 0,54 p < 0,001	R = 0,42 p < 0,001
Grupa 2/ Group 2	R = 0,56 p < 0,001	R = 0,56 P < 0,001	R = 0,78 p < 0,001	R = 0,75 p < 0,001	R = 0,72 p < 0,001

4.14.3. Analiza korelacji VEGF z parametrami immunologicznymi u dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1) oraz u dzieci z cukrzycą typu 1 po 4 latach obserwacji (grupa 2)

U dzieci z cukrzycą typu 1 zarówno na początku badania (grupa 1) jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2) stwierdzono ujemną statystycznie znaczącą korelację pomiędzy poziomem VEGF w surowicy krwi a poziomem IL-12 ($R = -0,29$, $p^1 < 0,001$; $R = -0,46$, $p^2 < 0,001$), poziomem IL-10 ($R = -0,35$, $p^1 < 0,001$; $R = -0,49$, $p^2 < 0,001$) oraz istotną dodatnią korelację pomiędzy poziomem VEGF a poziomem TNF- α ($R = 0,54$, $p^1 < 0,004$; $R = 0,71$, $p^2 < 0,001$) w surowicy krwi. Ponadto wykazano na początku badania istotną dodatnią korelację pomiędzy VEGF w surowicy krwi a poziomem IL-6 w surowicy krwi ($R = 0,35$, $p^1 < 0,001$) oraz IL-6 w moczu ($R = 0,34$, $p^1 < 0,001$) (tab. 39).

Tab. 39. Wyniki korelacji VEGF w surowicy z parametrami immunologicznymi w grupie 1 i grupie 2.

Tab. 39. The results of the correlation analysis between serum VEGF levels and immunologic parameters characterizing the patients of the group 1 and the group 2 respectively.

VEGF (pg/ml) surowica / serum	TNF- α (pg/ml) surowica / serum	IL-12 (pg/ml) surowica / serum	IL-10 (pg/ml) surowica / serum
Grupa 1 / Group 1	$R = 0,54$ $p < 0,001$	$R = -0,29$ $p < 0,001$	$R = -0,35$ $p < 0,001$
Grupa 2 / Group 2	$R = 0,71$ $p < 0,001$	$R = -0,46$ $p < 0,001$	$R = -0,49$ $p < 0,001$

4.15. CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA, BIOCHEMICZNA I IMMUNOLOGICZNA PACJENTÓW NA POCZĄTKU BADANIA Z UWZGLĘDNIENIEM ROZWOJU RETINOPATII CUKRZYCOWEJ

Na początku badania wykazano u 26 (14%) spośród 185 badanych dzieci z cukrzycą typu 1 retinopatię cukrzycową. We wszystkich przypadkach była to retinopatia nieproliferacyjna w stadium wczesnym do umiarkowanego według klasyfikacji ETDRS (Elary Treatment Diabetic Retinopathy Study). Ponadto pacjenci ze zmianami w narządzie wzroku wykazywali pełną ostrość wzroku do dali i bliży, a ich ośrodki optyczne były przeziernie.

W grupie pacjentów z udokumentowaną retinopatią cukrzycową dodatkowo stwierdzono u 14 dzieci z cukrzycą typu 1 mikroalbuminurię, u 4 pacjentów mikroal-

buminurię i nadciśnienie tętnicze. W grupie pacjentów bez udokumentowanej retinopatii cukrzycowej u 14 dzieci wykryto mikroalbuminurię, u żadnego natomiast pacjenta nie stwierdzono nadciśnienia tętniczego (tab. 40).

Tab. 40. Współistniejące powikłania w grupie pacjentów z udokumentowaną retinopatią i bez retinopatii cukrzycowej na początku badania.

Tab. 40. The list of coexistent complications in diabetic patients presenting with documented retinopathy and those without diabetic retinopathy at the beginning of the study.

Pacjenci z retinopatią cukrzycową Patients with diabetic retinopathy Grupa 1C / Group 1C (n = 26)	Pacjenci bez retinopatii cukrzycowej Patients without diabetic retinopathy Grupa 1D / Group 1D (n = 159)
14 mikroalbuminuria <i>14 microalbuminuria</i>	14 mikroalbuminuria <i>14 microalbuminuria</i>
4 współistnienie mikroalbuminurii z nadciśnieniem tętniczym <i>4 microalbuminuria and hypertension</i>	-

4.15.1. Parametry kliniczne i biochemiczne na początku badania u pacjentów z udokumentowaną retinopatią (grupa 1C) oraz u pacjentów bez retinopatii cukrzycowej (grupa 1D)

Na podstawie wyniku badania okulistycznego pacjentów z cukrzycą typu 1 podzielono na 2 grupy. Grupę dzieci z cukrzycą typu 1, u których udokumentowano retinopatię (grupa 1C) oraz grupę pacjentów, u których nie stwierdzono zmian w narządzie wzroku (grupa 1D). Dane kliniczne i biochemiczne poszczególnych grup przedstawiono w tabeli 41. **Grupa pacjentów z retinopatią była starsza ($p<0,001$), charakteryzowała się statystycznie znamienym dłuższym czasem trwania choroby ($p<0,001$), istotnie wyższym BMI, istotnie wyższym poziomem HbA1c ($p<0,001$), cholesterolu całkowitego ($p=0,017$), jego frakcji LDL-cholesterolu ($p=0,012$), CRP ($p<0,001$), cystatyny C ($p<0,001$), istotnie wyższym dobowym poziomem wydalania albumin w moczu ($p<0,001$) oraz istotnie wyższym ciśnieniem skurczowym ($p=0,003$) i rozkurczowym ($p=0,002$). Nie wykazano natomiast znamienne statystycznych różnic między grupami w zakresie wieku zachorowania na cukrzycę, poziomu kreatyniny, trójglicerydów oraz frakcji HDL-cholesterolu w surowicy krwi (tab. 41).**

Tab. 41. Parametry kliniczne i biochemiczne na początku badania u pacjentów z retinopatią (grupa 1C) oraz u pacjentów bez retinopatii cukrzycowej (grupa 1D).

Tab. 41. Clinical and biochemical parameters of the patients with type 1 diabetes mellitus presenting with documented retinopathy (group 1C) and those without diabetic retinopathy (group 1D) assessed at the time of beginning of the study.

Parametry kliniczne i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 1C <i>Group 1C</i> (n=26)	Grupa 1D <i>Group 1D</i> (n=159)	p
Wiek (lata) / <i>Age (years)</i>	14,94 ± 2,8*	11,96 ± 3,78	<0,001
Płeć (K/M) / <i>Sex (F/M)</i>	14/12	81/78	0,784
Czas trwania choroby (lata) <i>Duration of diabetes (years)</i>	8,33 ± 3,48*	3,89 ± 2,60	<0,001
Wiek zachorowania (lata) <i>The age at diagnosis (years)</i>	7,19 ± 3,42	8,21 ± 3,64	0,205
BMI (kg/m ²)	21,32 ± 3,16*	18,81 ± 3,21	0,002
C-peptyd / <i>C-peptide (ng/ml)</i>	< 0.5	< 0.5	-
Glukoza w surowicy <i>Serum glucose (mg/dl)</i>	159,47 ± 47,75	150,41 ± 68,12	0,296
HbA1c (%)	9,47 ± 1,67	8,13 ± 1,82	<0,001
CRP (mg/l)	2,21 ± 1,02*	1,42 ± 1,03	<0,001
Kreatynina / <i>Creatinine (mg/dl)</i>	0,80 ± 0,11	0,74 ± 0,13	0,089
Albuminuria (mg/dobę)	52,00 (2,40 – 244,0)*	14,58 (0,2 – 241,0)	<0,001
Cystatyna C / <i>Cystatine C (mg/l)</i>	0,86 ± 0,18*	0,62 ± 0,20	<0,001
Cholesterol całkowity <i>Total cholesterol (mmol/l)</i>	185,50 ± 38,05*	166,13 ± 32,82	0,017
Cholesterol LDL <i>LDL-cholesterol (mmol/l)</i>	98,85 ± 28,33*	85,34 ± 25,40	0,012
Cholesterol HDL <i>HDL-cholesterol (mmol/l)</i>	58,35 ± 11,94	61,54 ± 13,46	0,308
Trójglicerydy <i>Triglycerides (mmol/l)</i>	82,92 ± 37,16*	79,97 ± 36,92	0,098
Ciśnienie skurczowe <i>Systolic blood pressure (mmHg)</i>	120,0 ± 13,0*	112,0 ± 11,0	0,003
Ciśnienie rozkurczowe <i>Diastolic blood pressure (mmHg)</i>	77,0 ± 10,0*	71,0 ± 8,0*	0,002

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1C i grupą 1D (p<0,05)

* *statistical significance between group 1C and group 1D (p<0.05)*

4.15.2. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B na początku badania u pacjentów z udokumentowaną retinopatią (grupa 1C) oraz u pacjentów bez retinopatii cukrzycowej (grupa 1D)

Aktywność enzymu NAG (p<0,001) i jego izoenzymu A (p<0,001) w surowicy krwi oraz enzymu NAG (p<0,001) i jego izoenzymów A (p<0,001) i B (p<0,001)

w moczu u dzieci z udokumentowaną retinopatią cukrzycową była statystycznie
znamiennie wyższa w porównaniu do grupy pacjentów, u których nie stwierdzono
zmian w narządzie wzroku (tab. 42).

Tab. 42. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B na początku badania u
pacjentów z retinopatią (grupa 1C) oraz u pacjentów bez retinopatii cukrzycowej (grupa 1D).

*Tab. 42. Activity of the NAG enzyme and its A and B isoforms in patients with type 1 diabetes
mellitus presenting with documented retinopathy (group 1C) and those without diabetic
retinopathy (group 1D) assessed at the time of beginning of the study.*

Parametry biochemiczne Biochemical parameters	Grupa 1C / Group 1C (n=26)	Grupa 1D / Group 1D (n=159)	p
NAG w surowicy <i>Serum NAG (U/l)</i>	39,91 ± 11,11*	28,94 ± 13,18	<0,001
NAG A w surowicy <i>Serum NAG A (U/l)</i>	33,01 ± 10,8*	22,32 ± 11,57	<0,001
NAG B w surowicy <i>Serum NAG B (U/l)</i>	7,69 ± 2,6*	6,53 ± 2,91	0,051
NAG w moczu (U/g. kreat.) <i>Urine NAG (U/g cr.)</i>	30,36 ± 11,35*	15,74 ± 7,22	<0,001
NAG A w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG A (U/g cr.)</i>	22,18 ± 8,30*	11,73 ± 6,01	<0,001
NAG B w moczu (U/g. kreat.) <i>Urine NAG B (U/g cr.)</i>	6,11 ± 2,74*	3,86 ± 1,84	<0,001

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1C i grupą 1D ($p < 0,05$)

* *statistical significance between group 1C and group 1D ($p < 0.05$)*

4.15.3. Parametry immunologiczne na początku badania u pacjentów z udokumentowaną retinopatią (grupa 1C) oraz u pacjentów bez retinopatii cukrzycowej (grupa 1D)

W grupie pacjentów (grupa 1C), u których udokumentowano retinopatię cukrzycową stwierdzono znamiennie statystycznie wyższe średnie wartości poziomu TNF- α ($p < 0,001$), IL-6 ($p = 0,003$), VEGF ($p < 0,001$) w surowicy krwi i IL-6 ($p = 0,001$) w moczu oraz istotnie niższe wartości poziomu IL-12 ($p = 0,001$) i IL-10 ($p = 0,035$) w surowicy krwi niż w grupie dzieci, u których nie stwierdzono zmian w narządzie wzroku (grupa 1D) (tab. 43).

Tab. 43. Parametry immunologiczne na początku badania u pacjentów z retinopatią (grupa 1C) oraz u pacjentów bez retinopatii cukrzycowej (grupa 1D).

Tab. 43. Immunologic parameters of the patients with type 1 diabetes mellitus presenting with documented retinopathy (group 1C) and those without diabetic retinopathy (group 1D) assessed at the time of beginning of the study.

Parametry immunologiczne <i>Immunologic parameters</i>	Grupa 1C / Group 1C (n=26)	Grupa 1D / Group 1D (n=159)	p
TNF- α w surowicy <i>Serum TNF-α (pg/ml)</i>	3,65 (0,00 – 10,4)*	1,15 (0,00 – 7,1)	<0,001
VEGF w surowicy <i>Serum VEGF (pg/ml)</i>	419,06 (182,7 – 803,3)*	217,49 (13,45 – 1064,1)	<0,001
IL-6 w surowicy <i>Serum IL-6 (pg/ml)</i>	2,34 (0,02 – 6,25)*	0,96 (0,00 – 1,9)	0,003
IL-6 w moczu <i>Urine IL-6 (pg/g kreat.)</i>	2,80 (0,00 – 5,88)*	1,14 (0,00 – 2,32)	0,001
IL-12 w surowicy (pg/ml) <i>Serum IL-12 (pg/ml)</i>	0,83 (0,00 – 3,75)*	1,99 (0,00 – 18,8)	0,001
IL-10 w surowicy (pg/ml) <i>Serum IL-10 (pg/ml)</i>	0,83 (0,00 – 4,4) *	1,77 (0,00 – 14,8)	0,035

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1C i 1D ($p < 0,05$)

* *statistical significance between group 1C and group 1D ($p < 0.05$)*

4.16. ANALIZA PORÓWNAWCZA PARAMETRÓW KLINICZNYCH, BIOCHEMICZNYCH I IMMUNOLOGICZNYCH PACJENTÓW Z UDOKUMENTOWANĄ RETINOPATIĄ I BEZ ZMIAN W NARZĄDZIE WZROKU Z GRUPĄ DZIECI ZDROWYCH

4.16.1. Parametry kliniczne i biochemiczne na początku badania u pacjentów z udokumentowaną retinopatią (grupa 1C) i bez retinopatii cukrzycowej (grupa 1D) oraz u dzieci zdrowych

Dzieci z przewlekłą cukrzycą typu 1 i z retinopatią (grupa 1C) oraz bez udokumentowanej retinopatii cukrzycowej (grupa 1D) charakteryzowały się odpowiednio statystycznie znamiennym wyższym poziomem HbA1c ($p^1 < 0,001$; $p^2 = 0,001$), CRP ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$), istotnie wyższym dobowym poziomem wydalania albumun w moczu ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,005$), istotnie wyższym ciśnieniem skurczowym ($p^1 < 0,000$; $p^2 = 0,008$) i rozkurczowym ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$) w porównaniu do grupy dzieci zdrowych. Nie wykazano natomiast różnic znamienne statystycznych między grupą 1C i grupą kontrolną oraz grupą 1D i grupą dzieci zdrowych w zakresie

poziomu kreatyniny w surowicy krwi. Poziom cystatyny C był istotnie wyższy w grupie dzieci z retinopatią cukrzycową w porównaniu do dzieci zdrowych ($p^1 < 0,001$), ale nie różnił się istotnie porównując grupę dzieci bez objawów zmian w narządzie wzroku z grupą kontrolną ($p^2 = 0,953$) (tab. 44).

Tab. 44. Parametry kliniczne i biochemiczne na początku badania u pacjentów z retinopatią (grupa 1C) i bez retinopatii cukrzycowej (grupa 1D) oraz u dzieci zdrowych.

Tab. 44. Clinical and biochemical parameters of the patients with type 1 diabetes mellitus presenting with documented retinopathy (group 1C), those without diabetic retinopathy (group 1D) and healthy children.

Parametry kliniczne i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 1C <i>Group 1C</i> (n=26)	Grupa 1D <i>Group 1D</i> (n=159)	Grupa kontrolna <i>Control group</i> (n=86)	p
Wiek (lata) / <i>Age (years)</i>	14,94 ± 2,8 ¹	11,96 ± 3,78 ²	13,4 ± 4,1	0,117 ¹ 0,251 ²
Płeć (K/M) / <i>Sex (F/M)</i>	14/12 ¹	81/78 ²	52/34	0,181 ¹ 0,231 ²
BMI (kg/m ²)	21,32 ± 3,16* ¹	18,81 ± 3,21 ²	17,3 ± 2,6	<0,001 ¹ 0,008 ²
Glukoza w surowicy <i>Serum glucose (mg/dl)</i>	159,47 ± 47,75* ¹	150,41 ± 68,12* ²	88,8 ± 10,0	<0,001 ¹ <0,001 ²
HbA1c (%)	9,47 ± 1,67* ¹	8,13 ± 1,82* ²	4,2 ± 0,34	<0,001 ¹ <0,001 ²
CRP (mg/l)	2,21 ± 1,02* ¹	1,42 ± 1,03* ²	0,5 ± 0,4	<0,001 ¹ <0,001 ²
Kreatynina / <i>Creatinine</i> (mg/dl)	0,80 ± 0,11 ¹	0,74 ± 0,13 ²	0,7 ± 0,2	0,057 0,075
Albuminuria (mg/dobę)	52,00 (2,40 – 244)* ¹	14,5 (0,2 – 241,0)* ²	3,07 (0,2 – 12,5)	<0,001 ¹ <0,001 ²
Cystatyna C / <i>Cystatine C</i> (mg/l)	0,86 ± 0,18* ¹	0,62 ± 0,20 ²	0,6 ± 0,2	<0,001 ¹ 0,953 ²
Ciśnienie skurczowe <i>Systolic blood pressure</i> (mmHg)	120,0 ± 13,0* ¹	112,0 ± 11,0* ²	107,0 ± 8,0	<0,001 ¹ 0,008 ²
Ciśnienie rozkurczowe <i>Diastolic blood pressure</i> (mmHg)	77,0 ± 10,0* ¹	71,0 ± 8,0* ²	62,0 ± 6,0	<0,001 ¹ <0,001 ²

*¹ różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1C i grupą kontrolą ($p < 0,05$)

*² różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1D i grupą kontrolą ($p < 0,05$)

*¹ *statistical significance between group 1C and control group ($p < 0.05$)*

*² *statistical significance between group 1D and control group ($p < 0.05$)*

4.16.2. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B na początku badania u pacjentów z udokumentowaną retinopatią (grupa 1C) i bez retinopatii cukrzycowej (grupa 1D) oraz u dzieci zdrowych

Aktywność enzymu NAG ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$) i jego izoenzymów A ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$) i B ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$) w surowicy ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$) oraz enzymu NAG ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$) i jego izoenzymów A ($p^1 < 0,001$, $p^2 < 0,001$) i B ($p^1 < 0,001$, $p^2 < 0,001$) w moczu u dzieci z udokumentowaną retinopatią i bez zmian w narządzie wzroku była statystycznie znacząco wyższa w porównaniu do grupy dzieci zdrowych (tab. 45).

Tab. 45. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B na początku badania u pacjentów z retinopatią (grupa 1C) i bez retinopatii cukrzycowej (grupa 1D) oraz u dzieci zdrowych.

Tab. 45. Activity of the NAG enzyme and its A and B isoforms in patients with type 1 diabetes mellitus presenting with documented retinopathy (group 1C), those without diabetic retinopathy (group 1D) and healthy children.

Parametry biochemiczne <i>Biochemical parameters</i>	Grupa 1C <i>Group 1C</i> (n=26)	Grupa 1D <i>Group 1D</i> (n=159)	Grupa kontrolna <i>Control group</i> (n=86)	p
NAG w surowicy <i>Serum NAG (U/l)</i>	39,91 ± 11,11* ¹	28,94 ± 13,18* ²	14,64 ± 4,33	<0,001 ¹ <0,001 ²
NAG A w surowicy <i>Serum NAG A (U/l)</i>	33,01 ± 10,8* ¹	22,32 ± 11,57* ²	11,00 ± 4,08	<0,001 ¹ <0,001 ²
NAG B w surowicy <i>Serum NAG B (U/l)</i>	7,69 ± 2,6* ¹	6,53 ± 2,91* ²	3,51 ± 1,47	<0,001 ¹ <0,001 ²
NAG w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG (U/g cr.)</i>	30,36 ± 11,35* ¹	15,74 ± 7,22* ²	6,5 ± 2,0	<0,001 ¹ <0,001 ²
NAG A w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG A (U/g cr.)</i>	22,18 ± 8,30* ¹	11,73 ± 6,01* ²	4,1 ± 1,5	<0,001 ¹ <0,001 ²
NAG B w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG B (U/g cr.)</i>	6,11 ± 2,74* ¹	3,86 ± 1,84* ²	2,3 ± 0,9	<0,001 ¹ <0,001 ²

*¹ różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1C i grupą kontrolą ($p < 0,05$)

*² różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1D i grupą kontrolą ($p < 0,05$)

*¹ statistical significance between group 1C and control group ($p < 0.05$)

*² statistical significance between group 1D and control group ($p < 0.05$)

4.16.3. Parametry immunologiczne na początku badania u pacjentów z udokumentowaną retinopatią (grupa 1C) i bez retinopatii cukrzycowej (grupa 1D) oraz u dzieci zdrowych

W dalszym etapie badań dokonano także oceny porównawczej badanych cytokin w grupie dzieci z retinopatią (grupa 1C) i bez udokumentowanej retinopatii cukrzycowej (grupa 1D) z grupą dzieci zdrowych. **Dzieci z grupy 1C oraz z grupy 1D w porównaniu z dziećmi zdrowymi odpowiednio wykazywali statystycznie znamienne wyższe wartości poziomu TNF- α ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$), VEGF ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$); IL-10 ($p^1 < 0,001$; $p^2 < 0,001$) w surowicy krwi. Natomiast poziom IL-6 w surowicy krwi i w moczu różnił się istotnie tylko porównując grupę 1C z grupą 1D. Poziom IL-12 ($p^1 = 0,879$) i IL-10 ($p^1 = 0,062$) w surowicy krwi był wyższy u pacjentów z grupy 1C niż w grupie dzieci zdrowych, ale różnice te nie były istotne statystycznie. **Natomiast poziom IL-12 ($p^2 < 0,001$) i IL-10 ($p < 0,001$) w surowicy krwi w grupie dzieci bez udokumentowanej retinopatii cukrzycowej był statystycznie znamienne wyższy niż w grupie dzieci zdrowych** (tab. 46).**

Tab. 46. Parametry immunologiczne na początku badania u pacjentów z retinopatią (grupa 1C) oraz u pacjentów bez retinopatii cukrzycowej (grupa 1D) oraz u dzieci zdrowych.

Tab. 46. Immunologic parameters of the patients with type 1 diabetes mellitus presenting with presenting with documented retinopathy (group 1C), those without diabetic retinopathy (group 1D) and healthy children.

Parametry immunologiczne <i>Immunologic parameters</i>	Grupa 1C <i>Group 1C</i> (n=26)	Grupa 1D <i>Group 1D</i> (n=159)	Grupa kontrolna <i>Control group</i> (n=86)	p
TNF- α w surowicy <i>Serum TNF-α (pg/ml)</i>	3,65 (0,00 – 10,4)* ¹	1,15 (0,00 – 7,1)* ²	0,00 (0,00 – 0,00)	<0,001 ¹ <0,001 ²
VEGF w surowicy <i>Serum VEGF (pg/ml)</i>	419,6 (182,7 – 803,3)* ¹	217,49 (13,45 – 1064,1)* ²	60,0 (12,9 – 324,0)	<0,001 ¹ <0,001 ²
IL-6 w surowicy <i>Serum IL-6 (pg/ml)</i>	2,34 (0,00 – 6,25)* ¹	0,96 (0,00 – 1,9)	0,27 (0,00 – 1,2)	<0,001 ¹ 0,073 ²
IL-6 w moczu (pg/g kr.) <i>Urine IL-6 (pg/g cr.)</i>	2,80 (0,00 – 5,88)* ¹	1,14 (0,00 – 2,32)	0,22 (0,00 – 1,19)	<0,001 ¹ <0,055 ²
IL-12 w surowicy <i>Serum IL-12 (pg/ml)</i>	0,83 (0,00 – 3,75) ¹	1,99 (0,00 – 18,8)* ²	0,2 (0,00 – 2,5)	0,879 ¹ <0,001 ²
IL-10 w surowicy <i>Serum IL-10 (pg/ml)</i>	0,83 (0,00 – 4,4) ¹	1,77 (0,00 – 14,8)* ²	0,1 (0,00 – 1,0)	<0,062 ¹ <0,001 ²

*¹ różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1C i grupą kontrolą ($p < 0,05$)

*² różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1D i grupą kontrolą ($p < 0,05$)

*¹ statistical significance between group 1C and control group ($p < 0.05$)

*² statistical significance between group 1D and control group ($p < 0.05$)

4.17. CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA, BIOCHEMICZNA I IMMUNOLOGICZNA PACJENTÓW Z CUKRZYCĄ TYPU 1 PO 4 LATACH OBSERWACJI Z UWZGLĘDNIENIEM ROZWOJU RETINOPATII CUKRZYCOWEJ

Po 4 latach obserwacji wykazano u 36 (19,4%) spośród 185 badanych pacjentów retinopatię cukrzycową. We wszystkich przypadkach była to retinopatia nieproliferacyjna w stadium wczesnym do umiarkowanego według klasyfikacji ETDRS (Elary Treatment Diabetic Retinopathy Study). Ponadto pacjenci ze zmianami w narządzie wzroku wykazywali pełną ostrość wzroku do dali i bliży, a ich ośrodki optyczne były przeziernie.

Dodatkowo stwierdzono w grupie dzieci ze zmianami w narządzie wzroku u 7 pacjentów również mikroalbuminurię, a u 7 – mikroalbuminurię i nadciśnienie tętnicze. Natomiast u 26 spośród 149 pacjentów bez udokumentowanej retinopatii cukrzycowej stwierdzono nefropatię mikroalbuminurię (pacjenci leczeni inhibitorami ACE), a u 1 – nadciśnienie tętnicze (tab. 47).

Tab. 47. Współistniejące powikłania w grupie pacjentów z udokumentowaną retinopatią i bez retinopatii cukrzycowej po 4 latach obserwacji.

Tab. 47. The list of coexistent complications in diabetic patients presenting with documented retinopathy and those without diabetic retinopathy assessed after 4 years of clinical observation.

Pacjenci z retinopatią cukrzycową <i>Patients with diabetic retinopathy</i> Grupa 2C / Group 2C (n = 36)	Pacjenci bez retinopatii cukrzycowej <i>Patients without diabetic retinopathy</i> Grupa 2D / Group 2D (n = 149)
7 – mikroalbuminuria <i>7 – microalbuminuria</i>	25 – mikroalbuminuria <i>25 – microalbuminuria</i>
7 – współistnienie mikroalbuminurii z nadciśnieniem tętniczym <i>7 – microalbuminuria and hypertension</i>	1 – współistnienie mikroalbuminurii z nadciśnieniem tętniczym <i>1 – microalbuminuria and hypertension</i>

4.17.1. Parametry kliniczne i biochemiczne po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną retinopatią (grupa 2C) i bez retinopatii cukrzycowej (grupa 2D)

Dzieci z przewlekłą cukrzycą typu 1 i z retinopatią (grupa 2C) były starsze ($p < 0,001$), charakteryzowały się statystycznie znacząco dłuższym czasem trwa-

nia choroby ($p<0,001$), istotnie wyższym poziomem HbA1c ($p<0,001$), CRP ($p<0,001$), cystatyny C ($p<0,001$), cholesterolu całkowitego ($p=0,012$), trójglicerydów ($p=0,008$), istotnie wyższym dobowym poziomem wydalania albumun w moczu ($p<0,001$), istotnie wyższym ciśnieniem skurczowym ($p<0,001$) i rozkurczowym ($p=0,023$) oraz istotnie wyższym BMI ($p=0,031$) w porównaniu do pacjentów bez udokumentowanej retinopatii cukrzycowej (grupa 2D). Nie wykazano natomiast różnic znamienne statystycznych między badanymi grupami w zakresie wieku zachorowania na cukrzycę typu 1, poziomu kreatyniny, glukozy, frakcji HDL-cholesterolu i LDL-cholesterolu w surowicy krwi (tab. 48)

Tab. 48. Parametry kliniczne i biochemiczne po 4 latach obserwacji u pacjentów z retinopatią (grupa 2C) oraz u pacjentów bez retinopatii cukrzycowej (grupa 2D).

Tab. 48. Clinical and biochemical parameters of the patients with type 1 diabetes mellitus presenting with documented retinopathy (group 2C) and those without diabetic retinopathy (group 2D) assessed after 4 years of clinical observation.

Parametry kliniczne i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 2C <i>Group 2C</i> (n=36)	Grupa 2D <i>Group 2D</i> (n=149)	p
Wiek (lata) / <i>Age (years)</i>	19,28 ± 3,05*	15,76 ± 3,73	<0,001
Płeć (K/M) / <i>Sex (F/M)</i>	20/16	75/74	0,574
Czas trwania choroby (lata) <i>Duration of diabetes (years)</i>	11,56 ± 3,34*	7,68 ± 2,61	<0,001
Wiek zachorowania (lata) <i>The age at diagnosis (years)</i>	7,69 ± 3,76	8,18 ± 3,58	0,598
BMI (kg/m ²)	21,82 ± 2,75*	20,12 ± 3,27	0,031
C-peptyd / <i>C-peptide (ng/ml)</i>	< 0.5	< 0.5	-
Glukoza w surowicy <i>Serum glucose (mg/dl)</i>	143,33 ± 33,63	138,05 ± 39,81	0,333
HbA1c (%)	9,74 ± 1,91*	8,18 ± 1,66	<0,001
CRP (mg/l)	3,12 ± 1,41*	1,69 ± 1,51	<0,001
Kreatynina / <i>Creatinine (mg/dl)</i>	0,84 ± 0,11	0,75 ± 0,11	0,063
Albuminuria (mg/dobę)	46,77 (7,5 – 274,0)*	18,11 (0,9 – 236,6)	<0,001
Cystatyna C / <i>Cystatine C (mg/l)</i>	0,88 ± 0,14	0,66 ± 0,18	<0,001
Cholesterol całkowity <i>Total cholesterol (mmol/l)</i>	186,43 ± 36,25	171,4 ± 31,27	0,012
Cholesterol LDL <i>LDL-cholesterol (mmol/l)</i>	103,36 ± 35,77	93,14 ± 29,13	0,099
Cholesterol HDL <i>HDL-cholesterol (mmol/l)</i>	53,41 ± 11,86	57,37 ± 13,29	0,143
Trójglicerydy <i>Triglycerides (mmol/l)</i>	108,32 ± 41,79	82,13 ± 41,91	0,008

Parametry kliniczne i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 2C <i>Group 2C</i> (n=36)	Grupa 2D <i>Group 2D</i> (n=149)	p
Ciśnienie skurczowe <i>Systolic blood pressure (mmHg)</i>	121,0 ± 9,0*	114,0 ± 10,0	<0,001
Ciśnienie rozkurczowe <i>Diastolic blood pressure (mmHg)</i>	76,0 ± 9,0*	72,0 ± 7,0*	0,023

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 2C i grupą 2D ($p < 0,05$)

* *statistical significance between group 2C and group 2D ($p < 0.05$)*

4.17.2. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną retinopatią (grupa 2C) i bez retinopatii cukrzycowej (grupa 2D)

Aktywność enzymu NAG ($p < 0,001$) i jego izoenzymów A ($p < 0,001$) i B ($p = 0,002$) w surowicy krwi oraz enzymu NAG ($p < 0,001$) i jego izoenzymów A ($p < 0,001$) i B ($p < 0,001$) w moczu u dzieci z udokumentowaną retinopatią (grupa 2C) była statystycznie znamienne wyższa w porównaniu do grupy pacjentów bez zmian w narządzie wzroku (grupa 2D) (tab. 49).

Tab. 49. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B po 4 latach obserwacji u pacjentów z retinopatią (grupa 2C) oraz u pacjentów bez retinopatii cukrzycowej (grupa 2D).

Tab. 49. Activity of the NAG enzyme and its A and B isoforms in patients diagnosed with type I diabetes mellitus presenting with documented retinopathy (group 2C) and those without diabetic retinopathy (group 2D) assessed after 4 years of clinical observation.

Parametry biochemiczne <i>Biochemical parameters</i>	Grupa 2C / Group 2C (n=36)	Grupa 2D / Group 2D (n=149)	p
NAG w surowicy <i>Serum NAG (U/l)</i>	46,64 ± 13,75*	31,26 ± 13,96	<0,001
NAG A w surowicy <i>Serum NAG A (U/l)</i>	36,92 ± 12,83*	23,54 ± 12,79	<0,001
NAG B w surowicy <i>Serum NAG B (U/l)</i>	9,72 ± 2,65*	7,78 ± 2,52	0,002
NAG w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG (U/g cr.)</i>	36,79 ± 9,48*	18,94 ± 10,28	<0,001
NAG A w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG A (U/g cr.)</i>	26,94 ± 8,64*	14,66 ± 10,81	<0,001
NAG B w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG B (U/g cr.)</i>	9,44 ± 2,44*	4,91 ± 2,98	<0,001

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 2C i grupą 2D ($p < 0,05$)

* *statistical significance between group 2C and group 2D ($p < 0.05$)*

4.17.3. Parametry immunologiczne po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną retinopatią (grupa 2C) i bez retinopatii cukrzycowej (grupa 2D)

Pacjenci z objawami retinopatii cukrzycowej (grupa 2C) w porównaniu z pacjentami bez zmian w narządzie wzroku (grupa 2D) wykazywały statystycznie znacząco wyższe wartości poziomu TNF- α ($p < 0,001$) i VEGF ($p < 0,001$) w surowicy krwi oraz istotnie niższe wartości IL-12 ($p < 0,001$) i IL-10 ($p < 0,001$) w surowicy krwi (tab. 50).

Tab. 50. Parametry immunologiczne po 4 latach obserwacji u pacjentów z retinopatią (grupa 2C) oraz u pacjentów bez retinopatii (grupa 2D).

Tab. 50. Immunologic parameters of the patients diagnosed with type 1 diabetes mellitus presenting with documented retinopathy (group 2C) and those without diabetic retinopathy (group 2D) assessed after 4 years of clinical observation.

Parametry immunologiczne <i>Immunologic parameters</i>	Grupa 2C / <i>Group 2C</i> (n=36)	Grupa 2D / <i>Group 2D</i> (n=149)	p
TNF- α w surowicy <i>Serum TNF-α (pg/ml)</i>	5,68 (2,2 – 17,34)*	1,93 (0,00 – 13,6)	<0,001
VEGF w surowicy <i>Serum VEGF (pg/ml)</i>	647,9 (97,7 – 1023,3)*	332,6 (89,3 – 1003,2)	<0,001
IL-12 w surowicy <i>Serum IL-12 (pg/ml)</i>	0,77 (0,00 – 6,78)*	2,45 (0,00 – 13,2)	<0,001
IL-10 w surowicy <i>Serum IL-10 (pg/ml)</i>	0,50 (0,00 – 3,1) *	2,82 (0,00 – 19,2)	<0,001

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 2C i grupą 2D ($p < 0,05$)

* *statistical significance between group 2C and group 2D ($p < 0.05$)*

4.18. ANALIZA PARAMETRÓW KLINICZNYCH, BIOCHEMICZNYCH I IMMUNOLOGICZNYCH PACJENTÓW Z CUKRZYCĄ TYPU 1, U KTÓRYCH ZARÓWNO NA POCZĄTKU BADANIA, JAK I PO 4 LATACH OBSERWACJI NIE UDOKUMENTOWANO NEFROPATII I RETINOPATII CUKRZYCOWEJ

4.18.1. Parametry kliniczne i biochemiczne pacjentów, u których zarówno na początku badania (grupa 1E) jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2E) nie udokumentowano nefropatii i retinopatii cukrzycowej

W dalszej części pracy porównano te same parametry kliniczne i biochemiczne na początku badania (grupa 1E) i po 4 latach obserwacji pacjentów (grupa 2E), u których

przez cały okres prowadzonych badań nie udokumentowano objawów nefropatii i retinopatii cukrzycowej. **Nie wykazano istotnych różnic w zakresie HbA1c ($8,06 \pm 1,92$ vs $7,88 \pm 1,42$), CRP ($1,25 \pm 0,89$ vs $1,23 \pm 1,03$), cystatyny C ($0,58 \pm 0,19$ vs $0,60 \pm 0,16$) cholesterolu całkowitego ($165,50 \pm 28,56$ vs $168,29 \pm 29,23$), jego frakcji LDL ($87,04 \pm 25,76$ vs $91,23 \pm 28,78$) i HDL cholesterolu ($61,19 \pm 13,21$ vs $58,07 \pm 13,04$), trójglicerydów ($78,11 \pm 33,19$ vs $76,74 \pm 35,11$), ciśnienia skurczowego ($110,40 \pm 10,79$ vs $113,50 \pm 10,09$) i rozkurczowego ($70,10 \pm 8,23$ vs $71,71 \pm 6,81$) pomiędzy grupą E i grupą 2E.** Stwierdzono natomiast istotny wzrost poziomu dobowego wydalania albumin w moczu po 4 latach obserwacji ($8,72 \pm 5,80$ vs $10,79 \pm 6,07$), ale poziom albumin grupy 2E nie przekraczał 20 mg/dobę (tab. 51).

Tab. 51. Parametry kliniczne i biochemiczne pacjentów, u których zarówno na początku badania (grupa E) jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2E) nie udokumentowano nefropatii i retinopatii cukrzycowej.

Tab. 51. Clinical and biochemical parameters of the patients diagnosed with type 1 diabetes mellitus presenting with no sign of neither nephropathy nor retinopathy, assessed at the beginning of the study (group E) and after 4 years of clinical observation (group 2E).

Parametry kliniczne i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 1E <i>Group 1E</i> (n=123)	Grupa 2E <i>Group 2E</i> (n=123)	p
Wiek (lata) / <i>Age (years)</i>	$11,33 \pm 3,80^*$	$15,30 \pm 3,80$	$<0,001$
Płeć (K/M) / <i>Sex (F/M)</i>	60/63	60/63	0,781
Czas trwania choroby (lata) <i>Duration of diabetes (years)</i>	$3,24 \pm 2,03^*$	$7,12 \pm 2,05$	$<0,001$
Wiek zachorowania (lata) <i>The age at diagnosis (years)</i>	$8,22 \pm 3,70$	$8,22 \pm 3,70$	1
BMI (kg/m ²)	$18,50 \pm 3,13^*$	$19,90 \pm 1,30$	0,030
Glukoza w surowicy <i>Serum glucose (mg/dl)</i>	$146,84 \pm 49,20$	$134,63 \pm 32,72$	0,230
HbA1c (%)	$8,06 \pm 1,92$	$7,88 \pm 1,42$	0,489
CRP (mg/l)	$1,25 \pm 0,89$	$1,23 \pm 1,03$	0,363
Kreatynina / <i>Creatinine (mg/dl)</i>	$0,73 \pm 0,13$	$0,75 \pm 0,11$	0,089
Albuminuria (mg/dobę)	$8,72 \pm 5,80^*$	$10,79 \pm 6,07$	0,005
Cystatyna C / <i>Cystatine C (mg/l)</i>	$0,58 \pm 0,19$	$0,60 \pm 0,16$	0,098
Cholesterol całkowity <i>Total cholesterol (mmol/l)</i>	$165,50 \pm 28,56$	$168,29 \pm 29,23$	0,102
Cholesterol LDL <i>LDL-cholesterol (mmol/l)</i>	$87,04 \pm 25,76$	$91,23 \pm 28,78$	0,663
Cholesterol HDL <i>HDL-cholesterol (mmol/l)</i>	$61,19 \pm 13,21$	$58,07 \pm 13,04$	0,103

Parametry kliniczne i biochemiczne <i>Clinical and biochemical parameters</i>	Grupa 1E <i>Group 1E</i> (n=123)	Grupa 2E <i>Group 2E</i> (n=123)	p
Trójglicerydy <i>Triglycerides</i> (mmol/l)	78,11 ± 33,19	76,74 ± 35,11	0,674
Ciśnienie skurczowe <i>Systolic blood pressure</i> (mmHg)	110,0 ± 11,0	113,0 ± 10,0	0,061
Ciśnienie rozkurczowe (mmHg) <i>Diastolic blood pressure</i> (mmHg)	70,0 ± 8,0	72,0 ± 7,0	0,056

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1E i grupą 2E ($p < 0,05$)

* *statistical significance between group 1E and group 2E ($p < 0.05$)*

4.18.2. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B pacjentów, u których zarówno na początku badania (grupa 1E) jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2E) nie udokumentowano nefropatii i retinopatii cukrzycowej

Porównując aktywność enzymu NAG ($p=0,067$) i jego izoenzymu A ($p=0,088$) i B ($p=0,163$) w surowicy krwi oraz enzymu NAG ($p=0,058$) i jego izoenzymu B ($p=0,083$) w moczu u tych samych dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania (grupa 1E) i po 4 latach obserwacji (grupa 2E), u których przez cały okres prowadzonych badań nie stwierdzono objawów nefropatii i retinopatii cukrzycowej **nie wykazano również istotnych różnic w zakresie badanych enzymów, poza aktywnością izoenzymu A ($p=0,032$) w moczu, która była istotnie niższa w grupie 1E niż w grupie 2E** (tab. 52).

Tab. 52. Poziom aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów A i B pacjentów, u których zarówno na początku badania (grupa 1E) jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2E) nie udokumentowano nefropatii i retinopatii cukrzycowej.

Tab. 52. Activity of the NAG enzyme and its A and B isoforms in patients diagnosed with type 1 diabetes mellitus presenting with no sign of neither nephropathy nor retinopathy, assessed at the beginning of the study (group 1E) and after 4 years of clinical observation (group 2E).

Parametry biochemiczne <i>Biochemical parameters</i>	Grupa 1E <i>Group 1E</i> (n=123)	Grupa 2E <i>Group 2E</i> (n=123)	p
NAG w surowicy <i>Serum NAG (U/l)</i>	25,67 ± 9,89	27,34 ± 10,60	0,067
NAG A w surowicy <i>Serum NAG A (U/l)</i>	19,37 ± 8,33	20,06 ± 9,48	0,088
NAG B w surowicy <i>Serum NAG B (U/l)</i>	6,18 ± 2,89	7,17 ± 2,32	0,163
NAG w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG (U/g cr.)</i>	13,13 ± 4,75	14,52 ± 5,71	0,058
NAG A w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG A (U/g cr.)</i>	9,62 ± 3,93*	11,60 ± 9,73	0,032
NAG B w moczu (U/g kreat.) <i>Urine NAG B (U/g cr.)</i>	3,44 ± 1,48	3,82 ± 1,83	0,083

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1E i grupą 2E ($p < 0,05$)

* *statistical significance between group 1E and group 2E ($p < 0,05$)*

4.18.3. Parametry immunologiczne pacjentów, u których zarówno na początku badania (grupa 1E) jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2E) nie udokumentowano nefropatii i retinopatii cukrzycowej

W dalszym etapie badań nie wykazano istotnych różnic w zakresie poziomu TNF- α ($p=0,061$) porównując tą samą grupę pacjentów, u której zarówno na początku badania (grupa 1E), jak i po 4 latach (grupa 2E) nie stwierdzono objawów nefropatii i retinopatii cukrzycowej. Natomiast wykazano statystycznie znamienne niższe wartości poziomu VEGF oraz istotnie niższe wartości poziomu IL-12 i IL-10 w grupie 1E niż w grupie 2E (tab. 53).

Tab. 53. Parametry immunologiczne pacjentów, u których zarówno na początku badania (grupa 1E) jak i po 4 latach obserwacji (grupa 2E) nie udokumentowano nefropatii i retinopatii cukrzycowej.

Tab. 53. Immunologic parameters of the patients diagnosed with type 1 diabetes mellitus presenting with no sign of neither nephropathy nor retinopathy, assessed at the beginning of the study (Group E) and after 4 years of clinical observation (Group 2E).

Parametry immunologiczne <i>Immunologic parameters</i>	Grupa 1E <i>Group 1E</i> (n=123)	Grupa 2E <i>Group 2E</i> (n=123)	p
TNF- α w surowicy <i>Serum TNF-α (pg/ml)</i>	0,53 (0,00 – 4,6)	0,86 (0,00 – 5,1)	0,061
VEGF w surowicy <i>Serum VEGF (pg/ml)</i>	159,53 (13,45 – 731,5)*	199,78 (19,34 – 540,23)	0,008
IL-12 w surowicy <i>Serum IL-12 (pg/ml)</i>	2,45 (0,00 – 18,8)*	2,92 (0,00 – 13,2)	0,038
IL-10 w surowicy <i>Serum IL-10 (pg/ml)</i>	2,11 (0,00 – 14,8) *	3,30 (0,00 – 19,20)	0,001

* różnica istotna statystycznie pomiędzy grupą 1E i 2E ($p < 0,05$)

* *statistical significance between group 1E and group 2E ($p < 0.05$)*

4.19. CZYNNIKI RYZYKA ROZWOJU NEFROPATII CUKRZYCOWEJ

Analiza regresji logistycznej wieloczynnikowej dla zmiennej zależnej albuminurii wykazała, iż wartości poziomu VEGF (OR=15,1; $p=0,001$) CRP (OR=4,5; $p=0,007$), TNF- α (OR=2,2; $p=0,001$) (w kolejności według siły działania) są czynnikami istotnie zwiększającymi ryzyko wystąpienia nefropatii cukrzycowej w badanej grupie dzieci z cukrzycą typu 1. Ponadto wykazano, iż poziom IL-12 (OR=0,6; $p=0,001$) istotnie zmniejsza ryzyko rozwoju nefropatii cukrzycowej (ujemny współczynnik regresji) (tab. 54)

Tab. 54. Ryzyko wystąpienia nefropatii cukrzycowej w zależności od badanych zmiennych. Wyniki regresji logistycznej wieloczynnikowej.

Tab. 54. The risk of diabetic nephropathy with regard to the analyzed parameters. Results of multivariate logistic regression analysis.

Składowe modelu <i>Model components</i>	Współczynnik regresji <i>Coefficient of regression</i>	Błąd standardowy współczynnika regr. <i>Standard error of coefficient of regression</i>	p	Iloraz szans <i>Odds ratio</i>	95% przedział ufności <i>95% confidence interval</i>	
					min.	max
Wyraz wolny <i>Intercept</i>	-9,3	2,0	0,000			
VEGF	2,7	0,8	0,001	15,1	3,1	74,0
CRP	1,5	0,6	0,007	4,5	1,5	13,7
IL-12	-0,6	0,2	0,010	0,6	0,4	0,9
TNF- α	0,8	0,2	0,001	2,2	1,4	3,6

4.20. CZYNNIKI RYZYKA ROZWOJU RETINOPATII CUKRZYCOWEJ

Analiza regresji logistycznej wieloczynnikowej dla zmiennej zależnej retinopatii wykazała, iż wartości poziomu HbA1c (OR=153,7; $p=0,028$), VEGF (OR=32,5; $p=0,001$), czas trwania choroby (OR=3,1; $p<0,001$), TNF- α (OR=2,6; $p=0,037$) (w kolejności według siły działania) są czynnikami istotnie zwiększającymi ryzyko wystąpienia retinopatii cukrzycowej w badanej grupie dzieci z cukrzycą typu 1. Ponadto wykazano, iż poziom IL-12 (OR=0,6; $p=0,035$) istotnie zmniejsza ryzyko rozwoju retinopatii cukrzycowej (ujemny współczynnik regresji) (tab. 55).

Tab. 55. Ryzyko wystąpienia retinopatii cukrzycowej w zależności od badanych zmiennych. Wyniki regresji logistycznej wieloczynnikowej.

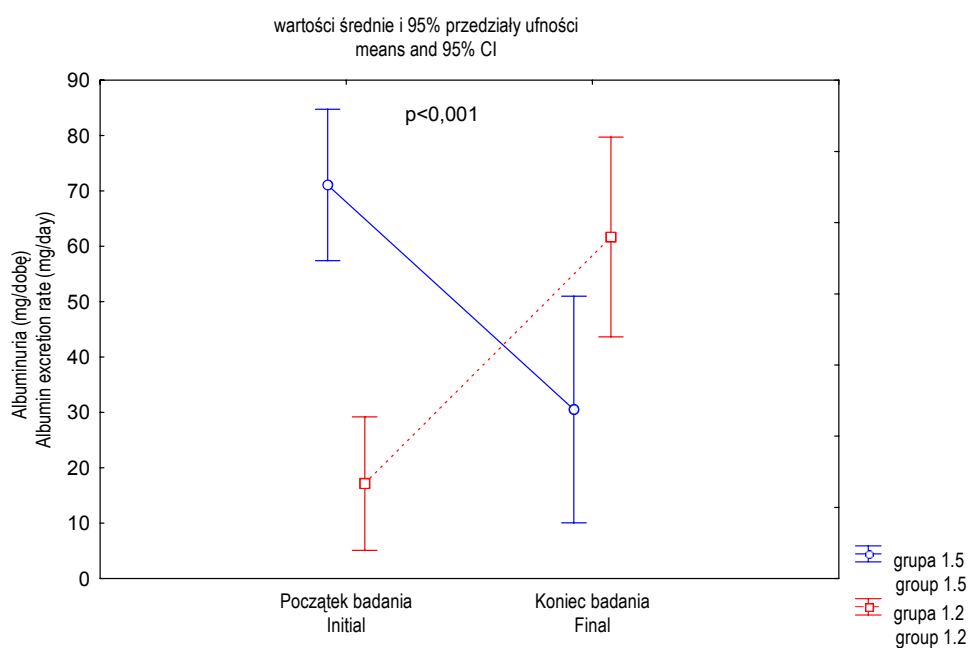
Tab. 55. The risk of diabetic retinopathy with regard to the analyzed parameters. Results of multivariate logistic regression analysis.

Składowe modelu <i>Model components</i>	Współczynnik regresji <i>Coefficient of regression</i>	Błąd standardowy współczynnika regr. <i>Standard error of coefficient of regression</i>	p	Iloraz szans <i>Odds ratio</i>	95% przedział ufności <i>95% confidence interval</i>	
					min.	max
Wyraz wolny <i>Intercept</i>	-18,6	3,0	0,000			
VEGF	3,5	1,0	0,001	32,5	4,3	244,6
Czas trwania DM	1,1	0,3	0,000	3,1	1,7	5,9
HbA1c%	5,0	2,3	0,028	153,7	1,7	13758,3
IL-12	-0,6	0,3	0,035	0,6	0,3	1,0
TNF- α	0,5	0,3	0,037	2,6	1,0	2,7

4.21. WYNIKI LECZENIA INHIBITORAMI KONWERTAZY ANGIOTENSYNY

4.21.1. Poziom wydalania albumin w moczu na początku badania i po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią i leczonych inhibitorami ACE-I (grupa 1.5, n=28) oraz u pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji bez leczenia ACE-I (grupa 1.2, n=32)

Poziom wydalania albumin w moczu u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (ACE-I) (grupa 1.5) obniżył się tylko do wartości $24,34 \pm 3,23$ mg/dobę (ryc. 44).

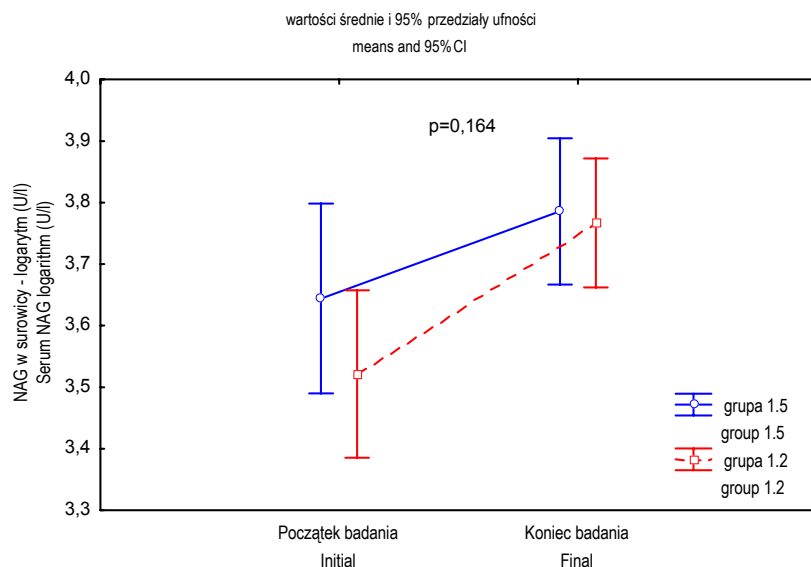


Ryc. 44. Wpływ leczenia inhibitorami ACE na poziom albuminurii. Współczynnik istotności dla interakcji $p < 0,001$.

Fig. 44. The effect of the treatment with ACE-inhibitors on the rate of albuminuria. P-value for the interaction is < 0.001 .

4.21.2. Aktywność enzymu NAG w surowicy krwi na początku badania i po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (grupa 1.5, $n=28$) oraz u pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji nieleczonych ACE-I (grupa 1.2, $n=32$)

Porównując grupę dzieci z cukrzycą typu 1 z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (grupa 1.5, $n=28$) z grupą pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji nie leczonych ACE-I (grupa 1.2, $n=32$) nie wykazano istotnych różnic w zakresie aktywności enzymu NAG w surowicy krwi w trakcie 4-letniej obserwacji ($p=0,164$) (ryc. 45).

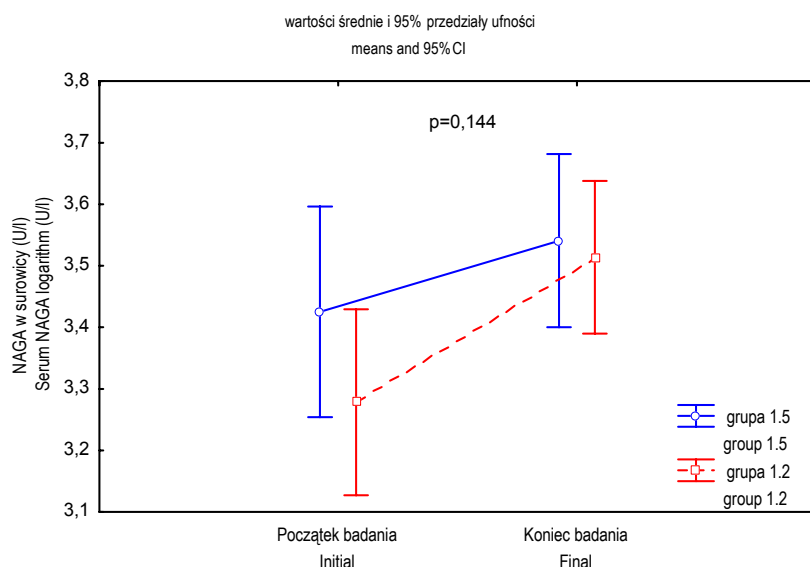


Ryc. 45. Wpływ leczenia inhibitorami ACE na poziom aktywności enzymu NAG w surowicy krwi. Współczynnik istotności dla interakcji $p < 0,001$.

Fig. 45. The effect of the treatment with ACE-inhibitors on the serum activity of the NAG enzyme. P-value for the interaction is < 0.001 .

4.21.3. Aktywność izoenzymu NAGA w surowicy krwi na początku badania i po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (grupa 1.5, n=28) oraz u pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji nieleczonych ACE-I (grupa 1.2, n=32)

Porównując grupę dzieci z cukrzycą typu 1 z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (ACE-I) (grupa 1.5)) z grupą pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji nie leczonych ACE-I (grupa 1.2) nie wykazano istotnych różnic w zakresie aktywności izoenzymu NAGA w surowicy krwi w trakcie 4-letniej obserwacji ($p=0,144$) (ryc. 46).

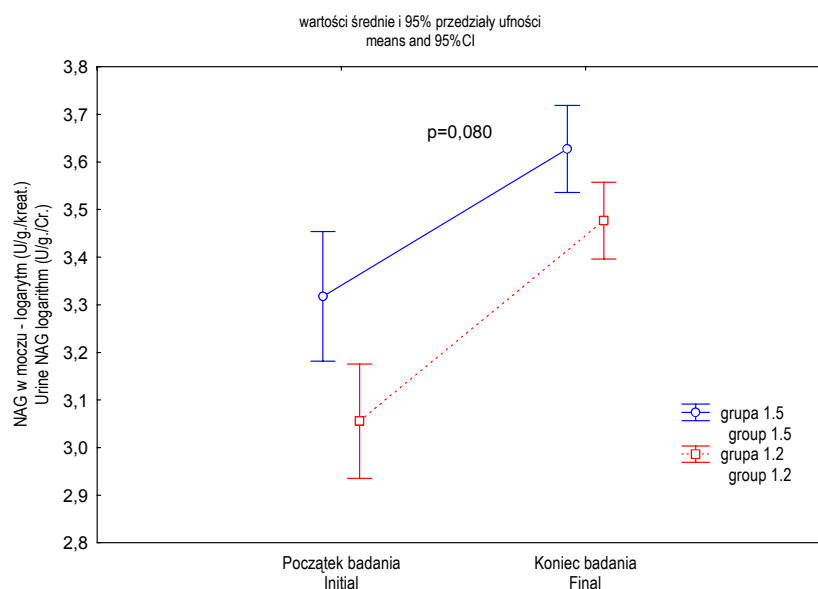


Ryc. 46. Wpływ leczenia inhibitorami ACE na aktywność izoenzymu NAG A w surowicy krwi. Współczynnik istotności dla interakcji $p < 0,001$.

Fig. 46. The effect of the treatment with ACE-inhibitors on the serum activity of the NAG A isoenzyme. P-value for the interaction is < 0.001 .

4.21.4. Aktywność enzymu NAG w moczu na początku badania i po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (grupa 1.5, $n=28$) oraz u pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji nieleczonych ACE-I (grupa 1.2, $n=32$)

Porównując grupę dzieci z cukrzycą typu 1 z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (ACE-I) (grupa 1.5) z grupą pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji nie leczonych ACE-I (grupa 1.2) nie wykazano istotnych różnic w zakresie aktywności enzymu NAG w moczu w trakcie 4-letniej obserwacji ($p=0,080$) (ryc. 47).

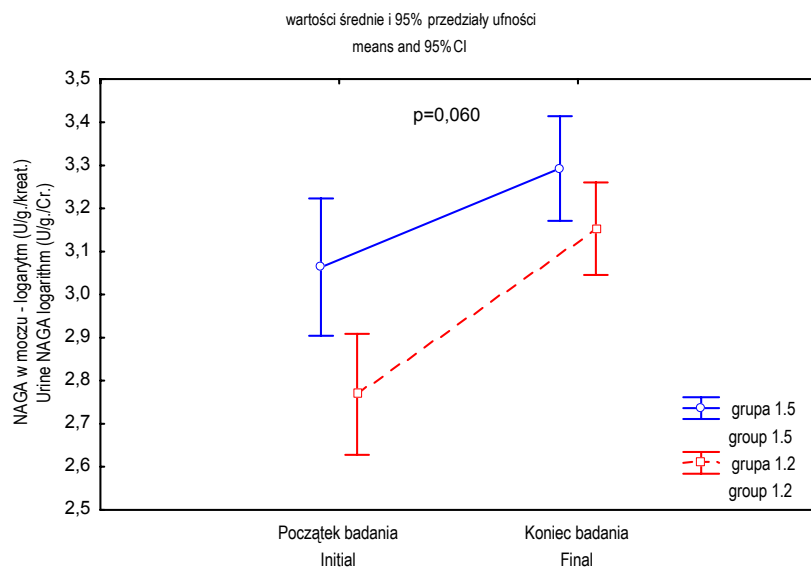


Ryc. 47. Wpływ leczenia inhibitorami ACE na aktywność enzymu NAG w moczu. Współczynnik istotności dla interakcji $p < 0,001$.

Fig. 47. The effect of the treatment with ACE-inhibitors on the urine activity of the NAG enzyme. P-value for the interaction is < 0.001 .

4.21.5. Aktywność izoenzymu NAGA w moczu na początku badania i po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (grupa 1.5, $n=28$) oraz u pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji nieleczonych ACE-I (grupa 1.2, $n=32$)

Porównując grupę dzieci z cukrzycą typu 1 z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (ACE-I) (grupa 1.5, $n=28$) z grupą pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji nieleczonych ACE-I (grupa 1.2, $n=32$) nie wykazano istotnych różnic w zakresie aktywności izoenzymu NAGA w moczu w trakcie 4-letniej obserwacji ($p=0,060$) (ryc. 48).

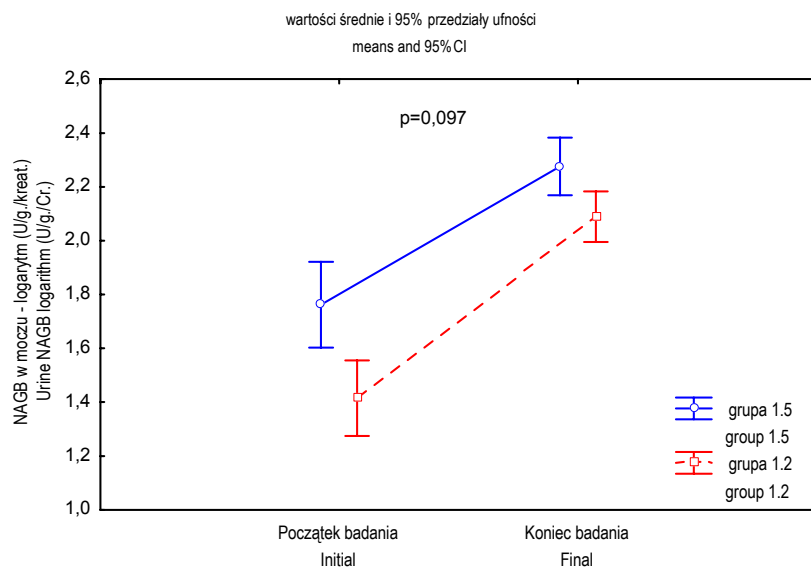


Ryc. 48. Wpływ leczenia inhibitorami ACE na aktywność izoenzymu NAG A w moczu. Współczynnik istotności dla interakcji $p < 0,001$.

Fig. 48. The effect of the treatment with ACE-inhibitors on the urine activity of the NAG A isoenzyme. P-value for the interaction is < 0.001 .

4.21.6. Aktywność izoenzymu NAGB w moczu na początku badania i po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (grupa 1.5, $n=28$) oraz u pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji nieleczonych ACE-I (grupa 1.2, $n=32$)

Porównując grupę dzieci z cukrzycą typu 1 z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (ACE-I) (grupa 1.5) z grupą pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji nieleczonych ACE-I (grupa 1.2) nie wykazano istotnych różnic w zakresie aktywności izoenzymu NAGB w moczu w trakcie 4-letniej obserwacji ($p=0,097$) (ryc. 49).

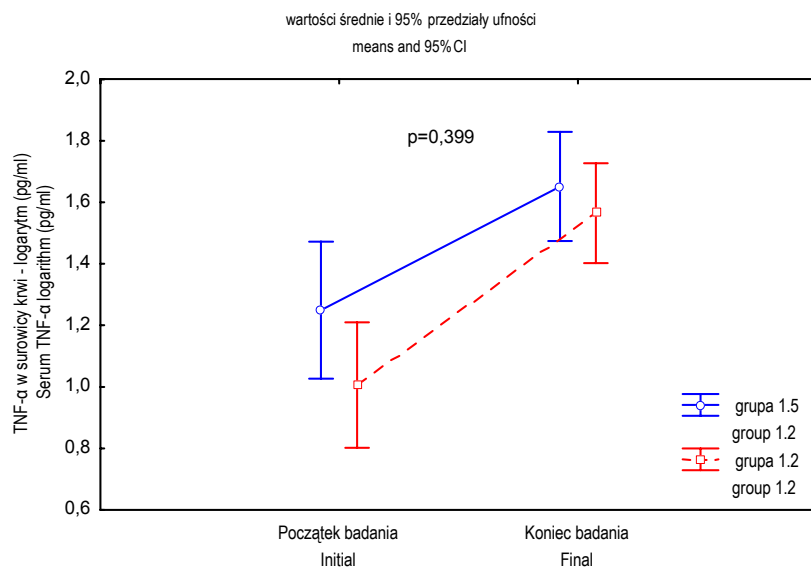


Ryc. 49. Wpływ leczenia inhibitorami ACE na aktywność izoenzymu NAG B w moczu. Współczynnik istotności dla interakcji $p < 0,001$.

Fig. 49. The effect of the treatment with ACE-inhibitors on the urine activity of the NAG B isoenzyme. P-value for the interaction is < 0.001 .

4.21.7. Poziom $\text{TNF-}\alpha$ w surowicy krwi na początku badania i po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (grupa 1.5, $n=28$) oraz u pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji nie leczonych ACE-I (grupa 1.2, $n=32$)

Porównując grupę dzieci z cukrzycą typu 1 z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (ACE-I) (grupa 1.5) z grupą pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji nie leczonych ACE-I (grupa 1.2) nie wykazano istotnych różnic w zakresie poziomu TNF w trakcie 4-letniej obserwacji ($p=0,399$) (ryc. 50).

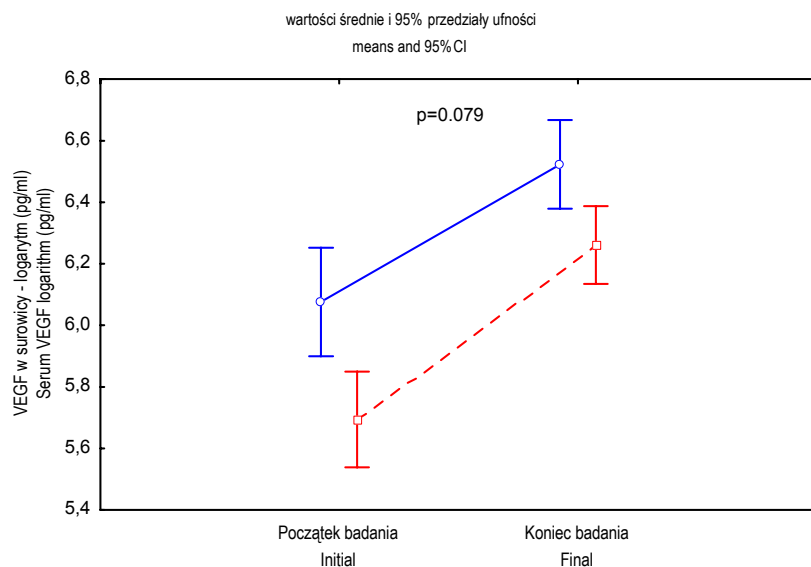


Ryc. 50. Wpływ leczenia inhibitorami ACE na poziom TNF- α w surowicy krwi. Współczynnik istotności dla interakcji $p < 0,001$.

Fig. 50. The effect of the treatment with ACE-inhibitors on the level of TNF- α in serum. P-value for the interaction is < 0.001 .

4.21.8. Poziom VEGF w surowicy krwi na początku badania i po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (grupa 1.5, $n=28$) oraz u pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji nie leczonych ACE-I (grupa 1.2, $n=32$)

Porównując grupę dzieci z cukrzycą typu 1 z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (ACE-I) (grupa 1.5, $n=28$)) z grupą pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji nie leczonych ACE-I (grupa 1.2, $n=32$) nie wykazano istotnych różnic w zakresie poziomu VEGF w trakcie 4-letniej obserwacji ($p=0,079$) (ryc. 51)

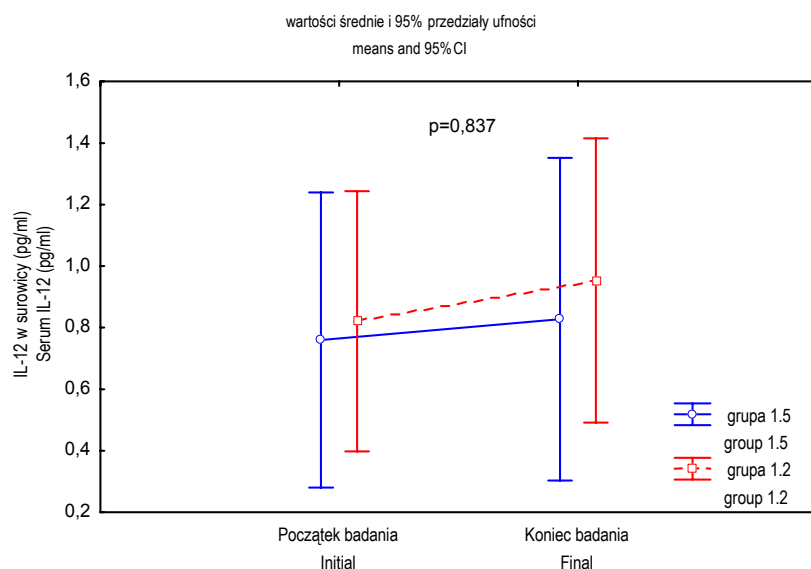


Ryc. 51. Wpływ leczenia inhibitorami ACE na poziom VEGF w surowicy krwi. Współczynnik istotności dla interakcji $p < 0,001$.

Fig. 51. The effect of the treatment with ACE-inhibitors on the level of the VEGF in serum. P-value for the interaction is < 0.001 .

4.21.9. Poziom IL-12 w surowicy krwi na początku badania i po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (grupa 1.5, $n=28$) oraz u pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji nie leczonych ACE-I (grupa 1.2, $n=32$)

Porównując grupę dzieci z cukrzycą typu 1 z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (ACE-I) (grupa 1.5) z grupą pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji nie leczonych ACE-I (grupa 1.2) nie wykazano istotnych różnic w zakresie poziomu IL-12 w trakcie 4-letniej obserwacji ($p=0,837$) (ryc. 52).

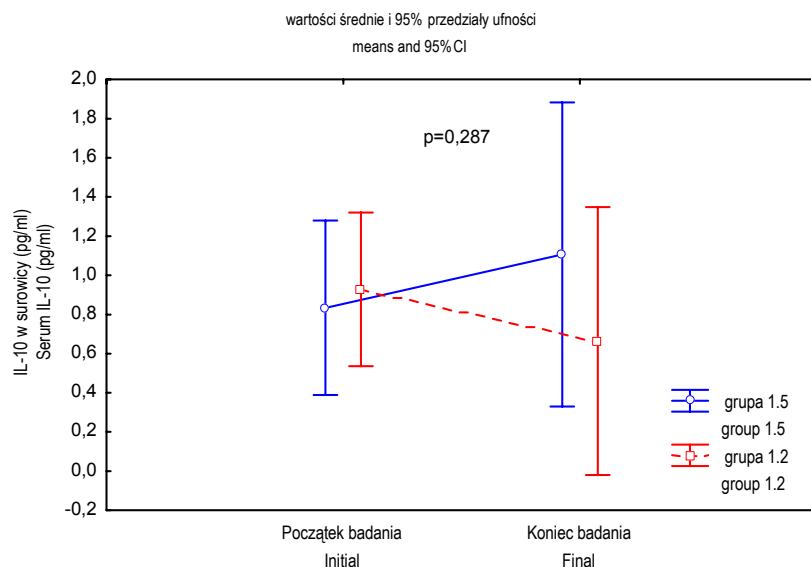


Ryc. 52. Wpływ leczenia inhibitorami ACE na poziom IL-12 w surowicy krwi. Współczynnik istotności dla interakcji $p < 0.001$.

Fig. 52. The effect of the treatment with ACE-inhibitors on the level of the IL-12 in serum. P-value for the interaction is < 0.001 .

4.21.10. Poziom IL-10 w surowicy krwi na początku badania i po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (grupa 1.5, $n=28$) oraz u pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji nie leczonych ACE-I (grupa 1.2, $n=32$)

Porównując grupę dzieci z cukrzycą typu 1 z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (ACE-I) (grupa 1.5) z grupą pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji i nie leczonych ACE-I (grupa 1.2) nie wykazano istotnych różnic w zakresie poziomu IL-10 w trakcie 4-letniej obserwacji ($p=0.287$), ale zaobserwowano w tym czasie tendencję do wzrostu poziomu IL-10 w grupie 1.5 oraz obniżania się poziomu tej cytokiny w grupie 1.2 (ryc. 53).

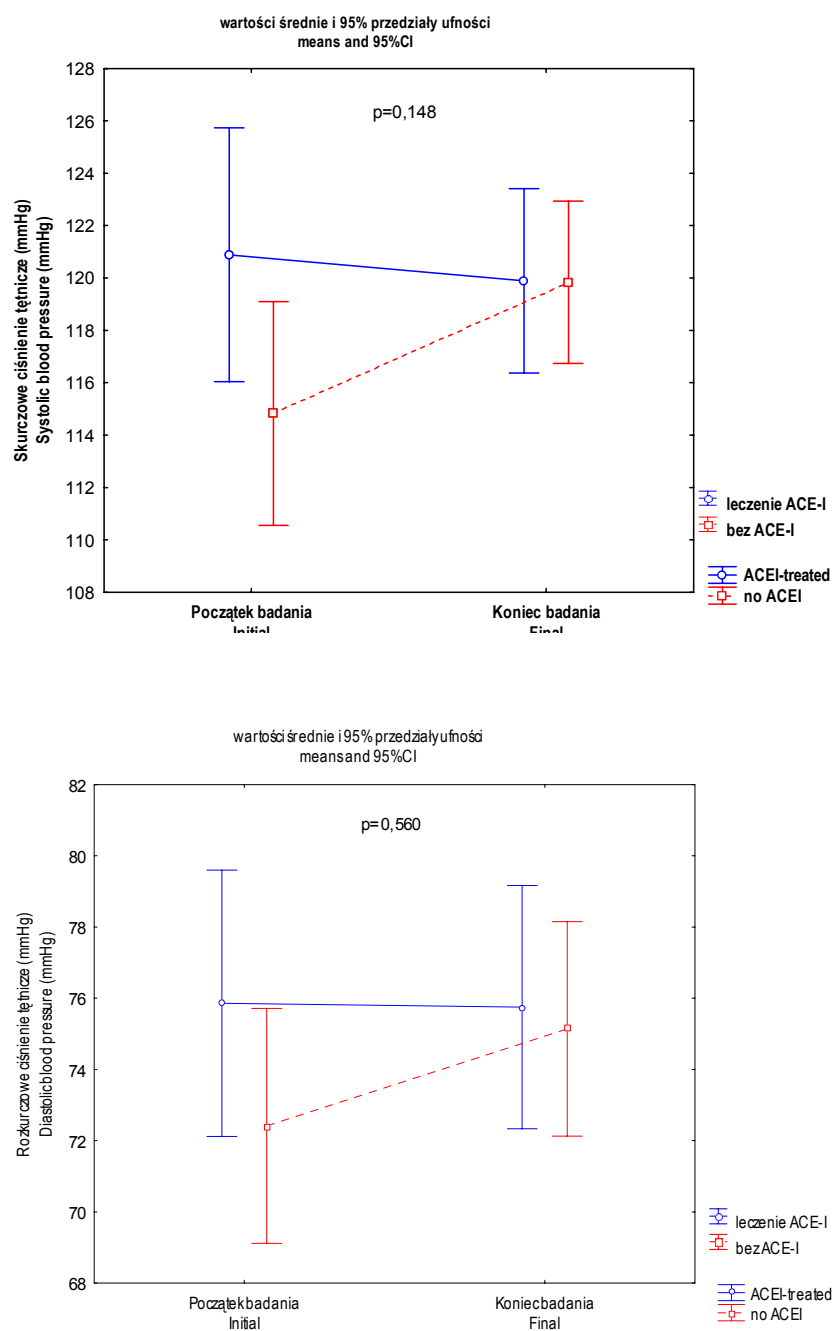


Ryc. 53. Wpływ leczenia inhibitorami ACE na poziom IL-10 w surowicy krwi. Współczynnik istotności dla interakcji $p<0,001$.

Fig. 53. The effect of the treatment with ACE-inhibitors on the level of the IL-10 in serum. P-value for the interaction is <0.001 .

4.21.11. Wielkość ciśnienia skurczowego i rozkurczowego na początku badania i po 4 latach obserwacji u pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (grupa 1.5, $n=28$) oraz u pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji nie leczonych ACE-I (grupa 1.2, $n=32$)

Porównując grupę dzieci z cukrzycą typu 1 z udokumentowaną mikroalbuminurią na początku badania i leczonych inhibitorami ACE (grupa 1.5) z grupą pacjentów z progresją w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji i nie leczonych ACE-I (grupa 1.2) nie wykazano istotnych różnic w zakresie wielkości ciśnienia skurczowego jak i rozkurczowego w trakcie 4-letniej obserwacji ($p=0,085$), ale zaobserwowano w tym czasie tendencję do wzrostu zarówno ciśnienia skurczowego jak i rozkurczowego w grupie 1.2 (ryc. 54).



Ryc 54. Wpływ leczenia inhibitorami ACE na wielkość ciśnienia skurczowego i rozkurczowego. Współczynnik istotności dla interakcji $p < 0,001$.

Ryc 54. The effect of the treatment with ACE-inhibitors on the values of systolic and diastolic arterial blood pressure. P-value for the interaction is < 0.001 .

5. DYSKUSJA

Nefropatia i retinopatia cukrzycowa są najpoważniejszymi późnymi powikłaniami rozwijającymi się u osób chorych na cukrzycę typu 1. Wynika to zarówno z ich wpływu na skrócenie czasu przeżycia pacjentów, jak i na jakość życia chorych w okresie rozwijającej się niewydolności nerek i narządu wzroku [185, 189]. Obecnie w codziennej praktyce lekarskiej markerami identyfikującymi osoby zagrożone wystąpieniem nefropatii i retinopatii cukrzycowej, jest zwiększone wydalenie albumin w moczu oraz zmiany patologiczne na dnie oka w badaniu okulistycznym [190 – 192]. Mikroalbuminuria tylko sporadycznie występuje w ciągu pierwszych 5 lat trwania cukrzycy. Najczęściej pojawia się ona po 6 latach od rozpoznania cukrzycy, a po 20 latach choroby odsetek występowania mikroalbuminurii wśród pacjentów osiąga nawet 50 – 60% [193,194]. W prezentowanej pracy u żadnego pacjenta nie stwierdzono mikroalbuminurii w ciągu pierwszych 5 lat trwania cukrzycy. Po upływie 5 lat trwania choroby mikroalbuminurię wykazano na początku badania w 2003 roku u 17,3% pacjentów, a po 4 latach obserwacji w 2007 roku nastąpił wzrost do 21%. Częstość występowania mikroalbuminurii w populacji chorych na cukrzycę typu 1 w wieku rozwojowym oceniana jest przez różnych autorów prac od 7 do 22% w zależności od liczebności i wieku badanej grupy oraz czasu trwania ich choroby [194 – 196].

W ciągu ostatnich lat autorzy podkreślają w swoich pracach, iż mikroalbuminuria jest objawem nie tylko rozwijającej się nefropatii cukrzycowej, ale również zmian w narządzie wzroku w przebiegu cukrzycy typu 1 [92, 93, 102, 197]. W badaniach tych autorzy zwracają ponadto uwagę na fakt, iż objawy nefropatii cukrzycowej w postaci mikroalbuminurii i makroalbuminurii zwiększają ryzyko rozwoju retinopatii nieproliferacyjnej oraz mogą nasilać postęp retinopatii nieproliferacyjnej i jej przejście w postać proliferacyjną. W przekrojowym badaniu EURODIAB stwierdzono, iż pacjenci z cukrzycą typu 1 i retinopatią wykazywali wyższe wydalenie albumin w moczu i wyższe ciśnienie tętnicze w porównaniu do pacjentów, którzy nie wykazywali zmian w narządzie wzroku [106]. W obecnej pracy również wykazano statystycznie znamienne wyższy dobowy poziom wydalania albumin w moczu oraz istotnie wyższe ciśnienie skurczowe i rozkurczowe w grupie dzieci z cukrzycą typu 1 i z udokumentowaną retinopatią

cukrzycową w porównaniu do grupy pacjentów bez zmian w narządzie wzroku zarówno na początku badania, jak i po 4 latach obserwacji.

Mimo prowadzonych licznych prac badawczych brak jednoznacznych poglądów określających częstość i przyczyny występowania nefropatii i retinopatii u dzieci z cukrzycą typu 1. Ale z większości doniesień wynika jednak, iż częstość zmian w narządzie wzroku i nerkach jest mniejsza lub nie stwierdza się jej wcale u dzieci, które zachorowały na cukrzycę typu 1 przed okresem pokwitania, z cukrzycą trwającą do 5-10 lat, prawidłowym poziomem lipidów, prawidłowym ciśnieniem tętniczym oraz prawidłowym wyrównaniem metabolicznym choroby [198 – 200].

Kullberg i wsp. w swoich badaniach wykazali, iż ryzyko retinopatii jest uzależnione przede wszystkim od wieku zachorowania na cukrzycę, niezależnie od wpływów czasu trwania choroby i kontroli glikemii [201]. Autorzy pracy stwierdzili, iż częstość retinopatii była najmniejsza w grupie pacjentów, u których cukrzycę typu 1 rozpoznano przed 6 rokiem życia. Zbliżone wyniki badań uzyskali Donaghue i wsp. [202] oraz Svensson i wsp. [203], którzy na podstawie badań prospektywnych stwierdzili, iż wiek zachorowania na cukrzycę typu 1 poniżej 5 roku życia znacznie opóźnia rozwój nefropatii i retinopatii cukrzycowej. W tych samych pracach autorzy zaobserwowali, iż nieprawidłowe wyrównanie metaboliczne w czasie pierwszych 5 lat trwania choroby u wszystkich pacjentów, niezależnie od wieku zachorowania na cukrzycę istotnie przyspiesza czas pojawienia się retinopatii cukrzycowej. Obserwacje własne udokumentowały fakt, iż zmiany w narządzie wzroku oraz mikroalbuminuria sporadycznie ujawniają się u dzieci z cukrzycą typu 1 przed upływem 5 lat trwania choroby. Natomiast analiza statystyczna nie wykazała istotnego związku pomiędzy wiekiem zachorowania na cukrzycę a ryzykiem rozwoju zarówno retinopatii jak i nefropatii cukrzycowej. Współzależność tą wykazano wprowadzając dodatkowo do analizy statystycznej, poza wiekiem zachorowania na cukrzycę typu 1 chorych również ich stopień wyrównania metabolicznego. Wykazano wówczas, iż **poziom HbA1c powyżej 10% miał istotny wpływ na wzrost wydalania albumin w moczu i rozwój zmian w narządzie wzroku, szczególnie u tych pacjentów, u których cukrzyca ujawniła się przed 10 roku życia.**

Nadal niewyjaśnionym problemem jest rola udziału istniejących zaburzeń w gospodarce lipidowej u chorego na cukrzycę typu 1 w rozwoju nefropatii i retinopatii cu-

krzycowej. Wyniki przeprowadzonych badań są niejednoznaczne i prowadzone były głównie w populacji osób dorosłych. Grupa licznych autorów uważa, iż wzrost poziomu trójglicerydów, cholesterolu, głównie jego frakcji LDL obserwowany w pierwszych latach choroby wpływa na rozwój mikroalbuminurii i zmian w narządzie wzroku [204 – 205]. Ostatnio pojawiły się prace sugerujące, iż stężenie cholesterolu jest niezależnym czynnikiem progresji zmian w nerkach w przebiegu cukrzycy typu 1, ale dopiero w fazie jawnej nefropatii cukrzycowej [206 – 207]. Autorzy tych prac uważają, że zwiększone wydalanie białek z moczem w postaci makroalbuminurii znacznie zaburza metabolizm gospodarki lipidowej. Ich zdaniem powstała dyslipidemia może doprowadzić do dalszej progresji nefropatii cukrzycowej, ale dopiero wtedy gdy ściany naczyń włosowatych kłębuszka nerkowego są już znacznie uszkodzone.

Prezentowane wyniki badań zaburzeń lipidowych u dzieci z cukrzycą typu 1 są również niejednoznaczne. Jedni autorzy w swoich pracach wykazali istniejące zaburzenia lipidowe u dzieci z cukrzycą typu 1, pomimo prawidłowego wyrównania metabolicznego choroby [208 – 210], ale z obciążonym wywiadem rodzinnym w kierunku chorób układu sercowo-naczyniowego [211]. Wyniki innych badań wskazują, iż w przebiegu cukrzycy typu 1 poziom trójglicerydów, frakcji LDL- i HDL-cholesterolu jest zależny od poziomu wyrównania metabolicznego choroby [212 – 214]. Jankowska i wsp. w przeprowadzonych badaniach stwierdziła istotną dodatnią korelację pomiędzy poziomem HbA1c a stężeniem trójglicerydów, cholesterolu całkowitego oraz jego frakcji LDL-cholesterolu, ale w grupie pacjentów chorujących na cukrzycę typu 1 dłużej niż 5 lat [215]. W obecnej pracy nie stwierdzono zaburzeń lipidowych u dzieci z cukrzycą typu 1 z poziomem HbA1c poniżej 7,5%. Zaburzenia profilu lipidowego w postaci tylko wzrostu cholesterolu całkowitego i jego frakcji LDL-cholesterolu jedynie wykazano u pacjentów z poziomem HbA1c powyżej 7,5% i z udokumentowaną retinopatią cukrzycową. Za interesujące spostrzeżenie należy przyjąć fakt, iż nie wykazano istotnych różnic w zakresie parametrów gospodarki lipidowej pomiędzy grupą dzieci z cukrzycą typu 1 a grupą dzieci zdrowych, a także pomiędzy grupą dzieci z udokumentowaną mikroalbuminurią a grupą pacjentów bez objawów nefropatii cukrzycowej. W przeprowadzonej analizie statystycznej nie wykazano również istotnego wzrostu poziomu cholesterolu całkowitego ($p=0,129$), jego frakcji LDL ($p=0,354$), jego frakcji HDL ($p=0,402$)

oraz poziomemu trójglicerydów ($p=0,082$) w czasie 4-letniej obserwacji badanych pacjentów. Podobne są obserwacje Głowińskiej i wsp., która nie wykazała istotnych różnic w zakresie wskaźników gospodarki lipidowej porównując grupę dzieci chorujących na cukrzycę typu 1 z grupą dzieci zdrowych [216]. Z kolei w badaniach Szadkowskiej i wsp. parametry gospodarki lipidowej nie różniły się istotnie porównując grupę dzieci z cukrzycą typu 1 z podwyższonym ciśnieniem tętniczym, określonym jako stan przednadciśnieniowy [217] z grupą pacjentów z prawidłowym ciśnieniem tętniczym [218]. Zaskakujące też były wyniki badań uzyskane przez Lipińską i wsp., która nie wykazała istotnych różnic pomiędzy parametrami lipidowymi porównując grupę pacjentów z cukrzycą typu 1 z objawami retinopatii nieproliferacyjnej z grupą chorych wolnych od powikłań naczyniowych [219]. Tymbardziej, iż Kordonouri i wsp. donoszą, iż u dzieci z cukrzycą typu 1 wyższy poziom trójglicerydów i LDL-cholesterolu może sprzyjać dalszej progresji już istniejącej retinopatii cukrzycowej [220].

Wyniki przedstawione w tej pracy oraz uzyskane z przeprowadzonych w ostatnich latach badaniach skłaniają mnie do wysunięcia wniosku, iż występowanie zaburzeń lipidowych u dzieci z cukrzycą typu 1 jest wyrazem już istniejących zaburzeń metabolicznych w przebiegu choroby, ale ich ujawnienie się jest związane z dłuższym czasem trwania choroby i z zaawansowanym stopniem rozwoju nefropatii i retinopatii cukrzycowej. Tak więc, prawidłowy profil lipidowy u dzieci z cukrzycą typu 1 w pierwszych latach choroby nie może gwarantować, iż w dalszym przebiegu cukrzycy nie rozwiną się objawy kliniczne nefropatii i retinopatii cukrzycowej.

Na obecnym etapie wiedzy już wiadomo, że zanim dojdzie do powstania klinicznie jawnych zmian na dnie oka oraz mikroalbuminurii u pacjentów z cukrzycą typu 1, w badaniu immunohistopatologicznym widoczne są już zmiany morfologiczne w obrębie siatkówki i kłębuszka nerkowego [55, 105]. Dlatego wciąż przedmiotem badań jest poszukiwanie jeszcze wcześniejszych wskaźników uszkodzenia narządu wzroku i nerek w pierwszych latach choroby, kiedy ogólnie dostępne i badane parametry funkcji tych narządów jeszcze nie wykazują nieprawidłowości [221].

W dotychczasowych opublikowanych badaniach własnych wskazałam udział enzymu NAG oraz cytokin prozapalnych i antyzapalnych w patogenezie nefropatii i retinopatii cukrzycowej u dzieci [89 – 91, 151 – 152, 160, 163]. Z przeglądu piśmiennictwa

wynika, że nie ma dotychczas prac prospektywnych ujmujących jednocześnie kilka czynników biochemicznych i immunologicznych w kontekście rozwoju nefropatii i retinopatii cukrzycowej w pierwszych latach choroby u dzieci z cukrzycą typu 1. **W początkowym etapie prezentowanej pracy wykazano, iż grupa dzieci z cukrzycą typu 1 i z udokumentowaną mikroalbuminurią charakteryzowały się statystycznie znaczącym wyższym poziomem wydalania albumin w moczu ($p < 0,001$), istotnie wyższym poziomem cystatyny C ($p < 0,001$) oraz istotnie wyższą aktywnością enzymu NAG i jego izoenzymów A i B w moczu ($p < 0,001$) w porównaniu do grupy dzieci zdrowych. Natomiast dokonując oceny porównawczej grupy pacjentów bez udokumentowanej mikroalbuminurii z grupą dzieci zdrowych istotne różnice wykazano tylko w zakresie aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów ($p < 0,001$), natomiast nie wykazano statystycznie znaczących różnic w zakresie cystatyny C.** Poziom kreatyniny w surowicy krwi nie różnił się istotnie statystycznie przy dokonaniu oceny porównawczej zarówno grupy pacjentów z udokumentowaną mikroalbuminurią, jak i bez mikroalbuminurii z grupą dzieci zdrowych. Tak więc, powszechnie dotychczas używany parametr oceniający funkcję nerek, poziom kreatyniny, nie jest wczesnym wskaźnikiem rozwoju mikroalbuminurii. Ponadto doniesienia licznych autorów wykazały, iż poziom kreatyniny wzrasta proporcjonalnie do rozwoju dziecka, a dobowy zbiórka moczu w celu oceny klirensu kreatyniny endogennej u dzieci jest często niedokładna [222]. Dlatego w ostatnich latach do diagnostyki wielkości filtracji kłębuszkowej wprowadzono oznaczenie poziomu cystatyny C, białka o niskiej masie cząsteczkowej, którego stężenie w surowicy krwi z jednej strony wzrasta przy spadku filtracji kłębuszkowej [70, 80, 223 – 225], z drugiej zaś strony u osób zdrowych utrzymuje się na stałym poziomie i jest niezależne od płci, wieku i BMI dziecka [58, 62]. Wartości poziomu cystatyny C uzyskane w niniejszej pracy u dzieci zdrowych wynosiły $0,6 \pm 0,2$ mg/l i były zbliżone do wartości stężenia tego białka podawanych przez innych autorów [58 – 59].

Analizując czas trwania choroby wykazano w obecnej pracy najwyższe stężenie cystatyny C w grupie dzieci chorujących na cukrzycę typu 1 powyżej 10 lat. Potwierdzeniem tego spostrzeżenia jest fakt, iż wraz z czasem trwania choroby, zwiększa się prawdopodobieństwo uszkodzenia błony podstawnej kłębuszka nerkowego i

rozwoju nefropatii cukrzycowej [185, 190, 223]. Wprawdzie nie uzyskano istotnych różnic w zakresie poziomu cystatyny C pomiędzy grupą dzieci bez udokumentowanej mikroalbuminurii a grupą dzieci zdrowych, ale śledząc poziom wydalania albumin w moczu u poszczególnych pacjentów przez 4 lata obserwacji stwierdzono, iż dzieci z cukrzycą i z progresją choroby w kierunku mikroalbuminurii, wykazywały istotnie wyższe wartości poziomu cystatyny C na początku badania, niż pacjenci w tym samym czasie, u których nie udokumentowano mikroalbuminurii zarówno na początku i na końcu badania ($0,88 \pm 0,16$ vs $0,58 \pm 0,19$; $p=0,013$). Zatem wydaje się, iż **monitorowanie poziomu cystatyny C u dzieci z cukrzycą typu 1 może pomóc w przewidywaniu rozwoju wczesnego etapu nefropatii, w tym mikroalbuminurii.**

Natomiast wykazanie w obecnej pracy istotnego wzrostu poziomu enzymu NAG i jego izoenzymów w moczu oraz nieznaczny tylko wzrost poziomu cystatyny C w grupie dzieci z cukrzycą typu 1, ale bez udokumentowanej mikroalbuminurii w porównaniu do grupy dzieci zdrowych sugeruje, że **w pierwszych latach choroby najpierw dochodzi do uszkodzenia nabłonka kanalika proksymalnego nerki, a następnie do powstania zmian patologicznych w błonie podstawnej kłębuszka nerkowego.** Dlatego uważam, że **badanie enzymu NAG w moczu u dzieci z cukrzycą typu 1 jest wcześniejszym markerem prognostycznym rozwoju mikroalbuminurii, niż oznaczenie poziomu cystatyny C.**

Dotychczas opublikowane prace na temat wzrostu aktywności enzymu NAG u dzieci z cukrzycą typu 1 dotyczą tylko jednorazowych badań przeprowadzonych u chorych. Dlatego nie wskazują precyzyjnie jaka wartość aktywności tego enzymu, pozwalałaby na określenie stopnia ryzyka rozwoju mikroalbuminurii u poszczególnych pacjentów [226 – 228]. W badaniach własnych w roku 2004 [91] podjęłam próbę określenia poziomu enzymu NAG i jego izoenzymów w moczu, który może predysponować do rozwoju mikroalbuminurii w grupie 62 dzieci z cukrzycą typu 1. W obecnej pracy, na większym materiale klinicznym, potwierdzono wcześniejsze wyniki badań oraz wskazano wartości prognostyczne enzymu NAG i jego izoenzymów w moczu, które mogą zapowiadać wkrótce pojawienie się mikroalbuminurii. **Stwierdzono, iż u dzieci z cukrzycą typu 1, poziom enzymu NAG wynosił $27,67 \pm 8,37$ U/g kreat., izoenzymu A – $21,93 \pm 7,24$ U/g kreat. oraz izoenzymu B – $5,74 \pm 2,23$ U/g kreat. na początku**

badania, może predysponować po kilku latach trwania choroby do rozwoju mikroalbuminurii. Natomiast istotnie niższe wartości aktywności enzymu NAG – $13,74 \pm 6,46$ U/g kreat., izoenzymu A – $9,73 \pm 4,01$ U/g kreat. oraz izoenzymu B – $3,58 \pm 1,64$ U/g kreat. na początku badania wskazują, iż u znacznej części dzieci z cukrzycą w tym czasie nie doszło jeszcze do uszkodzenia błony podstawnej nabłonka kanalikula proksymalnego i prawdopodobnie nie zostały jeszcze zapoczątkowane procesy patologiczne w obrębie kłębuszka nerkowego. W tej grupie dzieci z cukrzycą typu 1, po 4 latach obserwacji nie udokumentowano mikroalbuminurii co jest dowodem pośrednim słuszności mojego rozumowania.

Mechanizmy prowadzące do wzrostu aktywności enzymu NAG i jego izoenzymu B w moczu u chorych na cukrzycę typu 1 stanowią nadal przedmiot badań, bowiem specyficzny patomechanizm tego zjawiska nie został dotąd całkowicie poznany. Według Eblis i wsp. [229] wzrost aktywności enzymu NAG w moczu w tej grupie pacjentów jest zawsze dodatnio skorelowany z poziomem HbA1c. Zaprzeczają tej hipotezie wyniki badań Kordonurii i wsp [227]. Autorzy Ci wykazali istotny wzrost poziomu NAG w moczu u dzieci z cukrzycą typu 1 przy dość dobrym wyrównaniu metabolicznym choroby. Również w obecnej prezentowanej pracy na początku badania u pacjentów z czasem trwania choroby $4,5 \pm 3,1$ lat, nie stwierdzono istotnej dodatniej korelacji pomiędzy poziomem HbA1c a aktywnością enzymu NAG ($p=0,076$) i jego izoenzymu B ($p=0,287$) w moczu oraz statystycznie znamiennej różnicy w zakresie wartości aktywności izoenzymu B pomiędzy grupami o zróżnicowanym poziomie HbA1c ($p=0,105$). Dopiero po 4 latach obserwacji wykazano istotną zależność pomiędzy stopniem wyrównania metabolicznego choroby a aktywnością enzymu NAG w moczu. Wydaje się więc, iż w pierwszych latach trwania cukrzycy typu 1, przy wykluczeniu obecności innych czynników mających wpływ na uszkodzenie błony podstawnej nabłonka kanalikula proksymalnego nerki, istotny wzrost enzymu NAG w moczu, a szczególnie jego izoenzymu B, nie jest bezpośrednim wynikiem podwyższonego poziomu HbA1c, ale skutkiem udziału innych czynników, działających bezpośrednio cytotoksycznie na cewki nerkowe.

Nakamura [230] w przebiegu choroby Kawasaki oraz Sheen [231] u pacjentów po zabiegach kardiochirurgicznych wykazali związek pomiędzy stężeniem cytokin proza-

palnych w surowicy krwi i moczu a poziomem aktywności enzymu NAG w moczu, natomiast w dostępnym piśmiennictwie nie ma prac wykazujących związek uszkodzenia komórek błony podstawnej kanalików proksymalnych w powiązaniu z czynnikami immunologicznymi u dzieci z cukrzycą typu 1. **W dotychczasowych opublikowanych pracach własnych wykazałam istotną korelację pomiędzy aktywnością enzymu NAG w moczu a poziomem cytokin TNF- α , IL-6 w grupie dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 [163], jak i długotrwałą cukrzycą typu 1 [151 – 152, 160].** Mechanizm wzrostu enzymu NAG i jego izoenzymu B w moczu u pacjentów bez udokumentowanej mikroalbuminurii tłumaczy się filtracją TNF- α o niskiej masie cząsteczkowej przez nieuszkodzoną błonę podstawną kłębuszka nerkowego. Cytokina ta może wywołać efekt cytotoksyczny poprzez indukcję syntazy tlenu azotu w komórkach kanalików nerkowych i produkcję tlenu azotu [164, 165]. W dotychczasowych badaniach własnych [151-152,160,232] jak i w obecnej pracy wykazałam obok wzrostu aktywności enzymu NAG i jego izoenzymu B w moczu również istotny wzrost poziomu TNF- α nie tylko w grupie dzieci z cukrzycą typu 1 i z udokumentowaną mikroalbuminurią, ale również w grupie pacjentów bez objawów nefropatii cukrzycowej w porównaniu do grupy dzieci zdrowych. Ponadto potwierdzono istotną dodatnią korelację między poziomem TNF- α a aktywnością izoenzymu B w moczu ($R=0,29$; $p=0,002$), wykazując jednocześnie, iż siła tej korelacji istotnie wzrosła po 4 latach prowadzonych badań ($R=0,64$; $p<0,001$). **W prezentowanej pracy, 4-letni okres badań pozwolił zasugerować wartości prognostyczne poziomu TNF- α ryzyka rozwoju mikroalbuminurii. Stwierdzono, iż u dzieci z cukrzycą typu 1 z wyjściowym poziomem TNF- α w surowicy krwi – 3,51 (0,00-10,40) pg/ml i aktywnością izoenzymu B w moczu – $5,74 \pm 2,23$ U/g kreat. rozwinęła się po 4 latach obserwacji mikroalbuminuria.** Ponadto stwierdzono, iż tylko 17% pacjentów spośród badanej grupy nie wykazywało aktywności tej cytokiny na początku badania. Natomiast istotnie niższe **poziomy wartości TNF- α w surowicy krwi 0,63 (0,00 – 5,3) pg/ml oraz aktywności izoenzymu B w moczu – $3,58 \pm 1,64$ U/g kreat. w grupie dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania nie stwarzały na obecnym etapie badań ryzyka rozwoju mikroalbuminurii w czasie 4- letniej obserwacji.** Interesujący jest również fakt, iż u 81% spośród tej grupy pacjentów nie wykazano aktywności TNF- α w surowicy krwi. Co stanowi dodatkowy

dowód na istotną rolę tej cytokiny w uszkodzeniu nabłonka kanalikula proksymalnego nerki w pierwszych latach cukrzycy typu 1.

W badaniach eksperymentalnych na zwierzętach przeprowadzonych zarówno w okresie rozwoju nerek, jak i po jego zakończeniu, stwierdzono, iż komórki cewek proksymalnych są nie tylko źródłem enzymów, ale również czynników wzrostu, w tym VEGF [233]. W ciągu ostatnich lat autorzy prac [134, 234] wskazują na istotną rolę kanalikula proksymalnego nerki w produkcji VEGF w stanach hiperglikemii i wzrostu AGEs w surowicy krwi w stanach klinicznych prowadzących do jego niedokrwienia i niedotlenienia. Autorzy tych publikacji także mówią o udziale cytokin prozapalnych w uszkodzającym działaniu na komórki nabłonka kanalikula proksymalnego jak również podocytów. Cha i wsp w oparciu o uzyskane wyniki badań eksperymentalnych tłumaczą, że wzrost VEGF w surowicy krwi we wczesnym okresie nefropatii cukrzycowej, jeszcze przed wystąpieniem rozplemu komórek mezangium, można wiązać z istnieniem uszkodzeń podocytów, które są jego głównym źródłem syntezy [144]. Komórkami docelowymi dla VEGF w nerkach są komórki śródbłonka naczyń włosowatych kłębuszka nerkowego. Konsekwencją oddziaływania VEGF na komórki śródbłonka, z jednej strony jest stymulacja angiogenezy, z drugiej zaś strony wzrost przepuszczalności już istniejących naczyń krwionośnych [137 – 138].

W badaniach na zwierzętach z indukowaną cukrzycą wykazano zwiększającą się ekspresję VEGF w nerkach wraz z progresją zmian patologicznych prowadzących do nefropatii cukrzycowej [132, 235 – 237]. Cha i wsp w badaniach eksperymentalnych uzyskali wzrost ekspresji mRNA VEGF w komórkach kłębuszka nerkowego, w komórkach nabłonka kanalikula proksymalnego z towarzyszącym rozplemem komórek mezangium jeszcze przed wzrostem wydalania albumin w moczu [144]. Doniesienia z ostatnich lat wskazują, iż pomiar poziomu VEGF u pacjentów z cukrzycą typu 1 może stać się dodatkowym markerem prognostycznym w przewidywaniu rozwoju nefropatii cukrzycowej oraz może on wyprzedzać pojawienie się nieodwracalnych zmian w nerkach [133, 235, 238 – 239].

W badaniach własnych [146] oraz w obecnej prezentowanej pracy wykazano istotną gradację wzrostu poziomu VEGF porównując dzieci zdrowe, dzieci z cukrzycą typu 1, ale bez udokumentowanej mikroalbuminurii oraz grupę dzieci z objawami ne-

fropatii cukrzycowej. Ponadto **analiza porównawcza poziomów VEGF w surowicy krwi poszczególnych grup badanych pacjentów w zależności od historii rozwoju mikroalbuminurii wykazała, iż poziom cytokiny 470,81 (217,29 – 926,47) pg/ml na początku badania był związany z rozwojem po 4 latach jawnej nefropatii cukrzycowej. Natomiast istotnie niższy poziom VEGF 165,55 (13,45 – 731,58) pg/ml na obecnym etapie badań nie wpłynął na ujawnienie się mikroalbuminurii po 4 latach trwania choroby.**

W świetle ostatnich doniesień podkreśla się, iż mikroalbuminuria odzwierciedla uogólniony proces patologiczny, który nie tylko dotyczy kłębuszków nerkowych, ale również siatkówki oka [92, 93, 108]. Potwierdzeniem są wyniki badań eksperymentalnych na zwierzętach, w których autorzy prac wykazali równoczesne pojawienie się zmian morfologicznych w nerkach i narządzie wzroku w przebiegu cukrzycy [240 – 241]. Stwierdzili oni we wczesnym okresie choroby wzrost ekspresji mRNA VEGF nie tylko na podocytach, komórkach mezangium, ale również na pericytach. Dowodem na istotną rolę VEGF w rozwoju retinopatii cukrzycowej jest wykazanie zwiększonego stężenia tego białka w ciele szklistym u pacjentów poddanych witrektomii w okresie aktywnej neowaskularyzacji siatkówki [242 – 243]. W pracach eksperymentalnych wykazano ponadto, że nawet krótkotrwałe podwyższenie ekspresji VEGF wywołuje neowaskularyzację tęczówki oraz siatkówki [244 – 245], a podanie do ciała szklistego przeciwciał anti-VEGF powstrzymuje rozwój neowaskularyzacji siatkówkowej [246 – 247]. Pomimo prowadzonych badań wciąż istnieje wiele niewyjaśnionych zjawisk w patomechanizmie neowaskularyzacji. Aczkolwiek udowodniono, że podanie egzogenego VEGF było wystarczające do rozwoju nowych naczyń w obrębie siatkówki [147] to równocześnie wykazano na modelach zwierzęcych, iż obecność endo- lub egzogenego VEGF zawsze wywiera wpływ na przepuszczalność naczyń, nie zawsze jednak jest ona związana z towarzyszącym powstaniem nowych naczyń [148]. Ponadto autorzy tej samej pracy zauważyli, iż istnieje pewna grupa chorych z objawami neowaskularyzacji siatkówki, u których VEGF w ciele szklistym był niewykrywalny. Fakty te sugerują istotną rolę obok VEGF innych czynników prozapalnych w procesie angiogenezy w pierwszych latach cukrzycy.

Już na obecnym etapie badań należy przypuszczać, iż powstanie i rozwój zmian naczyniowych w obrębie narządu wzroku w przebiegu cukrzycy typu 1 u dzieci nie jest wynikiem działania jednego czynnika, ale zespołu czynników współdziałających ze sobą. Jednak wciąż nie jest znany czynnik inicjujący rozwój retinopatii cukrzycowej.

W prezentowanej pracy analiza regresji logistycznej wykazała, iż poziom HbA1c spośród badanych czynników miał największy wpływ na ryzyko rozwoju retinopatii nieproliferacyjnej w badanej grupie dzieci z cukrzycą typu 1. Pacjenci z udokumentowaną nieproliferacyjną retinopatią cukrzycową charakteryzowali się istotnie wyższym poziomem HbA1c w porównaniu do grupy dzieci bez zmian w narządzie wzroku ($9,47 \pm 1,67$ vs $8,13 \pm 1,82$; $p < 0,001$). Wyniki obecnej pracy korespondowały z wynikami autorów Service i wsp [107], Zhang [108] i wsp., którzy wykazali, iż poziom HbA1c poniżej 8,5% istotnie zmniejszał ryzyko postępu rozwoju retinopatii i nefropatii cukrzycowej. Potwierdzeniem tych spostrzeżeń są również badania EURODIAB Prospective Complications Study Group, które udokumentowały iż, zła kontrola metaboliczna jest silnym czynnikiem ryzyka rozwoju zarówno retinopatii nieproliferacyjnej, jak i progresji zmian w narządzie wzroku w kierunku retinopatii proliferacyjnej [248].

Pomimo licznych badań dokładny mechanizm uszkodzenia komórek siatkówki i jej naczyń uzależniony od hiperglikemii nie jest całkowicie poznany.

W świetle obecnej wiedzy wiadomo iż w warunkach hiperglikemii dochodzi do nasilenia nieenzymatycznej glikozylacji białek oraz autooksydacji glukozy, którym towarzyszy produkcja znacznej ilości toksycznych pochodnych tlenu (*ROS-reactive oxygen species*) [249 – 250]. Końcowe produkty glikacji białek (AGEs) poprzez swoiste receptory (RAGE) aktywują monocyty, makrofagi, komórki śródbłónka. Pobudzone komórki stają się wówczas źródłem prozapalnych cytokin: interleukiny-1 beta (IL-1 β), TNF- α , IL-6, IL-8 oraz czynników wzrostu: VEGF, TGF β i enzymów NAG i jego izoenzymów [157, 161]. W ostatnich latach szereg publikacji zostało poświęconych analizie markerów reakcji zapalnej we krwi u chorych na cukrzycę, jednak większość badań opierało się o populację osób dorosłych [149 – 150, 251 – 253]. Ponadto pomimo, coraz liczniejszych dowodów naukowych na istnienie związku pomiędzy istniejącym procesem zapalnym a rozwojem mikroangiopatii cukrzycowej, brak jest prospek-

tywnych badań przeprowadzonych u dzieci z rozpoznaną cukrzycą typu 1 w pierwszych latach choroby, oceniających u nich ryzyko rozwoju retinopatii.

W prezentowanej pracy badając wpływ wybranych cytokin na rozwój retinopatii cukrzycowej wykazano istotnie wyższy poziom TNF- α , VEGF w surowicy krwi u dzieci z cukrzycą typu 1 bez udokumentowanych zmian w narządzie wzroku, ale z podwyższoną aktywnością enzymu NAG i jego izoenzymu A w surowicy krwi w porównaniu z dziećmi zdrowymi. Progresja choroby w kierunku retinopatii cukrzycowej wiązała się z dalszym wzrostem poziomu HbA1c oraz wzmożeniem sekrecji VEGF, TNF- α do surowicy krwi, jak również ze wzrostem aktywności enzymu NAG. Wykazana w niniejszej pracy, istotna dodatnia korelacja, pomiędzy poziomem HbA1c a poziomem VEGF ($R=0,20$; $p=0,007$, $R=0,48$; $p<0,001$), TNF- α ($R=0,19$; $p=0,009$; $R=0,37$, $p<0,001$) w surowicy krwi, zarówno na początku w 2003 roku, jak i na końcu badania w 2007 roku, potwierdza znaczący wpływ kontroli glikemii na wydzielanie czynników prozapalnych u dzieci z cukrzycą typu 1. Tym bardziej, że udokumentowana siła tych korelacji istotnie wzrosła po 4 latach prowadzonych badań.

Dalsza analiza regresji logistycznej wykazała, iż kolejno VEGF oraz TNF- α są istotnymi czynnikami biorącym udział w rozwoju retinopatii cukrzycowej. Dodatnia statystycznie znamienne korelacja między VEGF ($R=0,54$; $p<0,001$; $R=0,71$; $p<0,001$) a TNF- α potwierdziła istotny współudział obu cytokin w procesie zapalnym u dzieci z cukrzycą typu 1 [146]. Autorzy nielicznych jeszcze prac podkreślają, iż VEGF jest nie tylko czynnikiem wzrostu śródbłonnków naczyń, ale także jednym z induktorów procesu zapalnego, poprzez stymulację syntezy TNF- α oraz IL-6 [154 – 155]. Z kolei inni autorzy rozważają TNF- α i IL-6 jako pośrednie induktory angiogenezy poprzez zwiększenie ekspresji VEGF [254]. Wysoki poziom cytokin prozapalnych w obrębie narządu wzroku w wyniku uszkodzenia bariery krwi-siatkówka i wzrostu przepuszczalności naczyń może być wynikiem nie tylko ich produkcji wewnątrz siatkówki oka, ale również spowodowany napływem z krwi obwodowej. Dane z literatury donoszą, iż poziom VEGF w surowicy krwi może odzwierciedlać jego poziom zarówno w obrębie narządu wzroku, jak i nerek. Hernandez i wsp. [154] wykazali w swojej pracy, iż podwyższony poziom VEGF w cieczy wodnistej oka u pacjentów z retinopatią cukrzycową istotnie kore-

lował z podwyższonym poziomem VEGF w surowicy krwi i był statystycznie znamienne wyższy w porównaniu z grupą osób zdrowych.

Cytokiny prozapalne indukują produkcję tlenku azotu [157, 255 – 256], który działa bezpośrednio cytotoksycznie na komórki docelowe oraz aktywuje kolejne makrofagi. Badania Ohmowi i wsp wykazały istotny związek pomiędzy poziomem uwalnianych cytokin prozapalnych i rekrutacją makrofagów, limfocytów T a stopniem retinopatii cukrzycowej [257]. Ponadto udowodniono, iż pobudzone makrofagi uwalniają obok cytokin również enzym NAG [157]. Wykazany w przeprowadzonych badaniach własnych w latach 2000 – 2006 [89 – 91, 151 – 152] oraz w obecnym badaniu wzrost aktywności NAG w surowicy krwi u pacjentów z cukrzycą typu 1 można pośrednio wiązać z ilością glukozy, która zostaje skierowana na szlaki metaboliczne będące niezależne od poziomu w surowicy krwi insuliny. Wtórny komórkowy niedobór enzymu NAG prowadzi do obniżenia katabolizmu glikoprotein oraz glikozaminoglikanów i odkładania się tych substancji w błonie podstawnej zarówno w siatkówce, spojówce oka jak i w kanalikach nerkowych oraz kłębuszkach nerkowych z jednoczesnym pogrubieniem błony podstawnej [258]. Zmiany te prowadzą do zwężenia światła naczyń włosowatych, niedotlenienia komórek śródbłónka oraz ich powodują ich dysfunkcję. Uszkodzenie komórek śródbłónka może wzmacniać dalszą aktywność zapalną, którą obserwuje się poprzez wzrost białka CRP oraz cytokin zapalnych w tym TNF- α i IL-6. A więc dochodzi do wzajemnej stymulacji procesu zapalnego, prowadzącego w konsekwencji do rozwoju retinopatii i nefropatii cukrzycowej. Inoue i wsp wykazali wzrost aktywności enzymu NAG w surowicy krwi u chorych na cukrzycę typu 2 w czasie ostrego stadium zawału mięśnia sercowego [259]. Podwyższona aktywność tego enzymu tłumaczona jest przez autorów uszkodzeniem komórek mięśnia sercowego przez czynniki zapalne. Uznali oni ocenę aktywności enzymu NAG w surowicy krwi jako czułego wskaźnika stopnia uszkodzenia tętnic wieńcowych, wykazując istotną korelację pomiędzy aktywnością tego enzymu a istniejącym zagrożeniem chorobą tętnic wieńcowych. W obecnej pracy analiza korelacji pomiędzy TNF- α i VEGF a enzymem NAG i jego izoenzymem A i B, wykazała istotną, narastającą w czasie choroby zależność między poziomami tych cytokin a aktywnością enzymatyczną NAG w surowicy krwi. Zatem **pomiar enzymu NAG w surowicy krwi wydaje się istotnym markerem określającym stopień**

nasilenia reakcji zapalnej u dzieci cukrzycą typu 1. Wyniki 4-letnich badań pozwoliły na sprecyzowanie wartości badanych cytokin oraz enzymu NAG, które z jednej strony mogą odzwierciedlać stopień zaawansowania toczących się procesów zapalnych u pacjentów z cukrzycą typu 1, z drugiej zaś strony, mogą też określić stopień ryzyka rozwoju retinopatii i nefropatii cukrzycowej u poszczególnych chorych. Poziom $\text{TNF-}\alpha$ – 0,53 (0,00 – 4,6) pg/ml, VEGF – 159,53 (13,45 – 731,5) pg/ml, enzymu NAG – $25,67 \pm 9,89$ U/l, jego izoenzymu A – $19,37 \pm 8,33$ U/l oraz izoenzymu B – $6,18 \pm 2,89$ U/l w surowicy krwi stwierdzony na początku badania u dzieci z cukrzycą typu 1, nie wiązał się w czasie 4-letniej obserwacji z rozwojem objawów klinicznych retinopatii i nefropatii cukrzycowej. Wartości tych parametrów istotnie były niższe niż wykazane u pacjentów z objawami klinicznymi retinopatii lub nefropatii cukrzycowej.

W niniejszej pracy grupa dzieci z objawami retinopatii i nefropatii cukrzycowej w porównaniu do badanej grupy pacjentów bez udokumentowanych zmian w narządzie wzroku i mikroalbuminurii oraz grupy dzieci zdrowych obok istotnie podwyższonego poziomu $\text{TNF-}\alpha$ i VEGF charakteryzowała się również statystycznie znamienym wyższym poziomem IL-6 w surowicy krwi i w moczu. Natomiast nie wykazano istotnych różnic w zakresie tej cytokiny porównując grupę dzieci wolnych od powikłań naczyniowych z grupą dzieci zdrowych. Już wcześniej Sekizuka i Suzuki wykazali, iż wzmożona produkcja IL-6 u pacjentów z cukrzycą typu 1 odzwierciedla dość późno ryzyko wystąpienia uszkodzenia nerek [260 – 261]. Potwierdzeniem tych spostrzeżeń są badania koreańskie, które sugerują, iż produkcja IL-6 w komórkach mezangium jest nieznaczna we wczesnym stadium nefropatii cukrzycowej, wzrasta dopiero w okresie jawnej mikroalbuminurii, kiedy wartość angiotensyny II, która jest głównym induktorem produkcji IL-6, jest wysoka [262]. Podobne spostrzeżenia poczynili inni autorzy prac, którzy wyższe wartości IL-6 wykazali u chorych na cukrzycę typu 1 w cieczy wodnistej i cieczy szklistej oka oraz w surowicy krwi, ale w zaawansowanej już postaci retinopatii proliferacyjnej [263 – 265]. Z kolei badania Doganay i wsp. nie wykazały istotnego wpływu IL-6 na rozwój retinopatii u pacjentów z cukrzycą typu 1 [157].

W świetle tych doniesień oraz uzyskanych wyników własnych potwierdzających występujący bardzo niski poziom IL-6 u dzieci z cukrzycą typu 1 w pierwszych latach

choroby, szczególnie w grupie pacjentów bez objawów klinicznych nefropatii i retinopatii cukrzycowej, zrezygnowano w dalszym etapie badań z oceny poziomu IL-6, który istotnie wzrasta, ale dopiero w okresie pojawienia się późnych powikłań naczyniowych.

Nie mniej jednak, na podstawie dotychczasowych wyników badań można wnioskować, iż pomimo, że **poziom IL-6 w surowicy krwi i w moczu u dzieci z cukrzycą typu 1 odzwierciedla raczej późny etap zapalenia, niemniej zestawienie go z wcześniejszymi markerami ryzyka powikłań wydaje się być istotny jako wspomagający parametr diagnostyczny do oceny stopnia zaawansowania zmian patologicznych w nerkach i narządzie wzroku.**

Przedmiotem licznych badań jest próba wyjaśnienia aktywacji układu immunologicznego pacjentów z długotrwałą cukrzycą typu 1 z rozwojem nefropatii i retinopatii cukrzycowej. Istnieje kilka hipotez tłumaczących obecność stanu zapalnego u tych chorych. Jedną z nich zakłada, iż nieprawidłowe wyrównanie metaboliczne i hiperglikemia są główną przyczyną wzrostu cytokin prozapalnych. W obecnej pracy wykazano istotną dodatnią zależność między poziomem HbA1c na aktywnością TNF- α , IL-6, VEGF oraz poziomem albumin w moczu. Są jednak znane prace, które wykazały rozwój mikroangiopatii cukrzycowej u pacjentów z cukrzycą typu 1 przy prawidłowym u nich wyrównaniu metabolicznym choroby. Danne i wsp. nie wykazali jednoznacznej zależności pomiędzy oceną wieloletniej kontroli glikemii a rozwojem retinopatii cukrzycowej u dzieci z cukrzycą typu 1 [266 – 277]. Autorzy Ci sugerują, iż kontrola glikemii jest ważnym, ale nie jedynym czynnikiem ryzyka mikroangiopatii. W niniejszej pracy, wprawdzie wykazano wzrost poziomu badanych cytokin wraz z pogarszającym się stopniem wyrównania metabolicznego cukrzycy, ale jednocześnie zaobserwowano, iż w grupie dzieci z cukrzycą typu 1 z poziomem HbA1c – $6,73 \pm 0,58\%$ na początku badania i $6,88 \pm 0,40\%$ po 4 latach obserwacji, poziom TNF- α i VEGF był istotnie wyższy niż obserwowany w grupie dzieci zdrowych. Zatem wydaje się, iż obserwowana w obecnej pracy podwyższona aktywność cytokinowa u dzieci z cukrzycą typu 1 z dość dobrym wyrównaniem metabolicznym choroby może wynikać z trwającego procesu autoimmunizacyjnego odpowiedzialnego za zniszczenie komórek β wysp trzustki we wczesnym okresie choroby. Kolejna hipoteza wyjaśniająca aktywację układu immunologicznego u dzieci z cukrzycą typu 1 zakłada, iż wzrost poziomu cytokin prozapalnych

w tej grupie chorych jest związany z przewlekłym niedokrwieniem i niedotlenieniem narządów obwodowych, które same mogą być źródłem produkcji tych cytokin w okresie ich uszkodzenia [156, 268].

Na podstawie dotychczasowej wiedzy wydaje się, iż powyższe hipotezy nie wykluczają się wzajemnie i jest możliwe, że źródłem podwyższonych cytokin prozapalnych w surowicy krwi i w moczu u pacjentów z cukrzycą typu 1, z jednej strony mogą to być pobudzone komórki układu immunologicznego w stanie niewyrównania metabolicznego choroby oraz uszkodzone narządy obwodowe, w tym nerki i narząd wzroku w wyniku zmian w ich mikrokrażeniu, z drugiej zaś strony obecność cytokin zapalnych w tej grupie pacjentów może być wynikiem trwającego procesu autoimmunizacyjnego zapoczątkowanego jeszcze w okresie prediabetes.

Doniesienia naukowe z ostatnich lat sugerują, iż produkcja cytokin antyzapalnych u osób chorych na cukrzycę typu 1 może być niewystarczająca w celu ograniczenia efektu neurotoksycznego działania cytokin prozapalnych na narząd wzroku i nerki. Limb i wsp. [269] wskazują, że działanie cytokin prozapalnych, które uległy filtracji kłębuszkowej nie jest hamowane przez cytokiny antyzapalne w obrębie nerki, ponieważ te ostatnie posiadają większą masę cząsteczkową niż cytokin prozapalne i nie są filtrowane przez nieuszkodzoną błonę podstawną kłębuszka nerkowego. W poprzednich badaniach własnych [151-152] oraz w obecnej pracy wykazano obniżony poziom IL-10 w surowicy krwi u dzieci z cukrzycą typu 1. Ponad 60% badanych pacjentów z objawami retinopatii i/lub nefropatii cukrzycowej nie wykazywało aktywności tej cytokiny w surowicy krwi. Znaczenie IL-10 dla rozwoju retinopatii i nefropatii cukrzycowej badano na modelach zwierzęcych. Pozbawienie zwierząt regulatorowych limfocytów TCD4+CD25+ produkujących IL-10 rozwijało spontanicznie zapalenie siatkówki i naczyńówki [166]. Natomiast złagodzenie objawów zapalenia wystąpiło po podaniu egzogennej IL-10. Terapia ta hamowała nadmierną sekrecję TNF- α oraz INF γ [167 – 168]. W prezentowanej pracy wykazano istotną ujemną korelację między poziomem IL-10 a TNF- α ($R = -0,29$, $p < 0,001$; $R = -0,48$, $p < 0,001$), VEGF ($R = -0,35$, $p < 0,001$; $R = -0,49$, $p < 0,001$), enzymu NAG ($R = -0,23$, $p = 0,002$; $R = -0,41$, $p < 0,001$) w surowicy krwi oraz enzymu NAG ($R = -0,26$, $p < 0,001$; $R = -0,49$, $p < 0,001$) w moczu. Ponadto zaobserwowano, iż siła tych korelacji rosła wraz z czasem trwania choroby. Analiza

wzajemnych korelacji między badanymi zmiennymi wykazała z jednej strony, istotne dodatnie zależności między poziomem HbA1c a aktywnością badanych cytokin prozapalnych, z drugiej zaś strony istotną ujemną korelację między poziomem HbA1c a IL-10 ($R = -0,19$, $p = 0,009$; $R = -0,41$, $p < 0,001$). Ponadto zaobserwowano, iż poziom HbA1c dopiero powyżej 10% istotnie obniżał wartość sekrecyjną IL-10. Można więc wnioskować, iż wysoki poziom cytokin prozapalnych u pacjentów ze znacznym stopniem niewyrównania metabolicznego nie jest hamowany przez niski poziom IL-10 i sprzyja rozwojowi nefropatii i retinopatii cukrzycowej. Analiza poziomu IL-10 w grupie badanych dzieci z cukrzycą typu 1 o różnym stopniu zaawansowania zmian w narządzie wzroku i nerkach pozwala przypuszczać, iż wyższa aktywność sekrecyjna IL-10 może wiązać się z ochronną rolą przed powstaniem późnych powikłań.

Stwierdzono, iż u dzieci z cukrzycą typu 1 z wyjściowym poziomem IL-10 w surowicy krwi – 0,91 (0,00 – 4,40) pg/ml rozwinęła się po 4 latach obserwacji mikroalbuminuria. Ponadto stwierdzono, iż tylko 7% pacjentów spośród tej grupy badanych dzieci, wykazywało aktywność tej cytokiny na początku badania. Natomiast istotnie wyższy poziom IL-10 stwierdzony w grupie dzieci z cukrzycą typu 1 na początku badania – 2,11 (0,00 – 14,80) pg/ml i na końcu badania – 3,30 (0,00 – 19,20) pg/ml prawdopodobnie pełnił ochronną rolę przed rozwojem nie tylko mikroalbuminurii, ale również retinopatii cukrzycowej w czasie 4-letniej obserwacji.

W ciągu ostatnich lat nieliczni jeszcze autorzy zasugerowali udział IL-12 w patogenezie późnych powikłań w przebiegu cukrzycy typu 1. IL-12 z jednej strony przyczynia się do rozwoju chorób autoimmunologicznych, w tym cukrzycy typu 1 [173 – 175], z drugiej zaś strony w nielicznych jeszcze badaniach *in vitro* i *in vivo* odkryto, iż cytokin ta może mieć właściwości antyangiogenne [270 – 272].

W prezentowanej pracy wykazano w grupie dzieci z cukrzycą typu 1 powikłaną retinopatią lub nefropatią istotny wyższy poziom TNF- α i VEGF oraz niższy poziom zarówno IL-10 jak i IL-12 w surowicy krwi w porównaniu do grupy pacjentów bez objawów retinopatii cukrzycowej. Ponadto wykazano istotną ujemną korelację zarówno na początku, jak i na końcu badania, między poziomem IL-12 a TNF- α ($R = -0,33$, $p < 0,001$; $R = -0,45$; $p < 0,001$) i VEGF ($R = -0,33$, $p < 0,001$; $R = -0,45$; $p < 0,001$). Uzyskane wyniki sugerują, iż na wzrost produkcji TNF- α i VEGF może wpływać niedostatecz-

na produkcja IL-12. Davis i wsp. na komórkach raka piersi dowiódł, iż IL-12 hamuje VEGF i reguluje reakcje komórek zrębowych, prowadząc do zmniejszenia produkcji metaloproteinaz (MMP-1) [273]. Natomiast Angiolillo w wsp wykazali silne właściwości antyangiogenne IL-12 za pośrednictwem chemikiny, białka IP-10 [270]. W niniejszej pracy analiza regresji logistycznej wykazała istotny wpływ niedoboru IL-12 u dzieci z cukrzycą typu 1 na ryzyko rozwoju mikroalbuminurii i zmian w narządzie wzroku. Wydaje się więc, iż równowaga między pro- i antyangiogennymi cytokinami jest jednym z czynników zapobiegających rozwojowi nefropatii i retinopatii cukrzycowej u tych dzieci. W prezentowanych badaniach stwierdzono, iż u dzieci z cukrzycą typu 1, utrzymujący się niski poziom TNF- α [0,53 (0,00 – 4,6) vs 0,86 (0,00 – 5,1)] i VEGF 159,53 [(13,45 – 731,5) vs 199,78 (19,34 – 540,23)] oraz narastający poziom IL-10 [2,11 (0,00 – 14,8) vs 3,30 (0,00 – 19,20)] i IL-12 [2,45 (0,00 – 18,8) vs 2,92 (0,00 – 13,2)] przez cały okres 4-letnich badań wiązał się z łagodnym przebiegiem choroby oraz nieujawnieniem się w tym okresie objawów nefropatii i retinopatii cukrzycowej.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, iż zmiany w narządzie wzroku i nerkach w przebiegu cukrzycy typu 1 u dzieci mogą zachodzić już w pierwszych latach choroby i w tym czasie prawdopodobnie są jeszcze odwracalne. Pierwsze lata cukrzycy typu 1 przypadające na okres dzieciństwa i młodości są więc najodpowiedniejszym momentem do podjęcia odpowiedniego postępowania terapeutycznego zanim dojdzie do nieodwracalnych uszkodzeń strukturalnych zarówno w obrębie narządu wzroku jak i nerce.

Dotychczas głównym sposobem leczenia przewlekłych powikłań mikronaczyniowych w przebiegu cukrzycy pozostaje nadal kontrola glikemii oraz stosowanie inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACE- *angiotensin-converting enzyme*). Ale coraz więcej autorów badań prospektywnych udowadnia, że nie zawsze prawidłowa kontrola glikemii i leczenie inhibitorami ACE chroni pacjenta przed rozwojem objawów nefropatii i retinopatii cukrzycowej [274 – 276]. Ponadto Ci sami autorzy zasygnalizowali, iż u części chorych na cukrzycę typu 1, mikroalbuminuria stanowiła zaawansowany, praktycznie nieodwracalny etap rozwoju mikroangiopatii cukrzycowej, pomimo poprawy wyrównania metabolicznego choroby. Potwierdzeniem tych spostrzeżeń są wyniki badań EURODIAB, które wykazały, iż po okresie 7 lat leczenia inhibitorami ACE stwierdzo-

no u 14% pacjentów z mikroalbuminurią rozwinięcie się przewlekłej makroalbuminurii, u 35% chorych nadal utrzymywanie się mikroalbuminurii, zaś u 51% obserwowanych pacjentów z mikroalbuminurią nastąpił powrót do normoalbuminurii [277]. W dostępnym piśmiennictwie brak jest prezentacji wyników długoletnich badań dotyczących efektów terapii inhibitorami ACE u dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1 powikłaną mikroalbuminurią. W obecnej pracy, efektem zastosowania leczenia inhibitorami ACE u 32 dzieci z cukrzycą typu 1 z udokumentowaną mikroalbuminurią była u 24 pacjentów regresja mikroalbuminurii, ale do poziomu dobowego wydalania albumin w moczu powyżej 20 mg/dobę. Natomiast u 8 pacjentów nadal utrzymywała się mikroalbuminuria, pomimo zwiększonej dawki leku i poprawy kontroli glikemii. Wyniki badań Perkinsa i wsp. z kolei wykazały, iż leczenie inhibitorami ACE pacjentów dorosłych chorych na cukrzycę typu 1 oraz stwierdzoną mikroalbuminurią nie były związane z jej regresją [274]. Autorzy Ci podkreślają, iż efekt terapeutyczny inhibitorów ACE u pacjentów z cukrzycą typu 1 był wyższy w prewencji progresji mikroalbuminurii do makroalbuminurii niż w regresji już utrwalonej mikroalbuminurii. Również w metaanalizie 698 osób dorosłych chorych na cukrzycę typu 1 z objawami mikroalbuminurii potwierdzono, iż inhibitory ACE zmniejszają ryzyko wystąpienia makroalbuminurii o 62%, ale nie mają większego wpływu na regresję istniejącej mikroalbuminurii [278].

W świetle dotychczasowej wiedzy na temat efektów leczenia inhibitorami ACE pacjentów z objawami nefropatii cukrzycowej wydaje się, iż kryterium rozpoznania mikroalbuminurii (poziomu dobowego wydalania albumin w moczu powyżej 30 mg/dobę), stanowi zaawansowany w praktyce nieodwracalny etap rozwoju nefropatii cukrzycowej. Już Rossing i wsp. [93] i Arun i wsp. [279] na podstawie wyników uzyskanych z kilkuletnich badań prospektywnych obejmujących osoby dorosłe z cukrzycą typu 1 zasugerowali, iż wartości poziomu albumin wydalanych w moczu powyżej 12 mg/dobę w tej grupie chorych mogą zapowiadać pojawienie się wkrótce mikroalbuminurii. Natomiast w prezentowanej pracy, poziom albuminurii powyżej 14 mg/dobę u dzieci z cukrzycą typu 1 wiązał się z progresją choroby w kierunku mikroalbuminurii po 4 latach obserwacji, a poziom dobowego wydalania albumin w moczu $8,72 \pm 5,80$ mg/dobę stwierdzony na początku badania nie zwiększył się istotnie po 4 latach i wyno-

sił $10,79 \pm 6,07$ mg/dobę. Ponadto w tej grupie chorych zarówno na początku, jak i na koniec badania nie stwierdzono objawów nefropatii i retinopatii cukrzycowej.

Dotychczas nie określono dokładnie, w którym momencie powinno się rozpocząć leczenie inhibitorami ACE u dzieci z cukrzycą typu 1, aby osiągnąć jak najlepszy efekt terapeutyczny oraz nie ustalono w tej grupie chorych znaczenia tych leków w zapobieganiu nefropatii cukrzycowej. Chiarelli i wsp. [280] i Feld [281] zalecają zastosowanie tych leków u wszystkich pacjentów z cukrzycą typu 1 z współistniejącym nadciśnieniem tętniczym oraz u chorych z prawidłowym ciśnieniem tętniczym, u których stwierdza się stałą mikroalbuminurię pomimo 6 – 12-miesięcznego okresu dobrej kontroli metabolicznej cukrzycy, a także u pacjentów obciążonych genetycznie nadciśnieniem tętniczym i/lub cukrzycą, pomimo prawidłowego ciśnienia tętniczego i bez stwierdzonej mikroalbuminurii, ale z poziomem wydalania albumin w moczu w górnym zakresie normy. Badania osób dorosłych z cukrzycą typu 1 wskazują, iż współwystępowanie cukrzycy i nadciśnienia tętniczego istotnie przyspiesza rozwój nefropatii i retinopatii cukrzycowej lub powoduje progresję już istniejących zmian w nerkach i narządzie wzroku poprzez uszkodzenie komórek śródbłonna i aktywację procesów zapalnych [282]. W prezentowanej pracy nadciśnienie tętnicze u dzieci z cukrzycą typu 1 zawsze było skojarzone z mikroalbuminurią i/lub retinopatią cukrzycową. Wyniki obecnej pracy sugerują, iż zastosowanie inhibitorów ACE u dzieci z cukrzycą typu 1, z już udokumentowaną mikroalbuminurią i istotnie wyższym poziomem ciśnienia tętniczego w porównaniu do pacjentów bez objawów nefropatii cukrzycowej, nie przynosi oczekiwanego efektu terapeutycznego. Wprawdzie uzyskano u poszczególnych pacjentów niższy poziom dobowego wydalania albumin w moczu, ale w górnych granicach przyjętych norm. Zatem stosowanie inhibitorów ACE u tych chorych na cukrzycę typu 1 może nie zahamować postępu zmian w kierunku klinicznie jawnej nefropatii cukrzycowej.

W publikowanych pracach autorzy podkreślają istotną rolę angiotensyny II w rozwoju nefropatii i retinopatii cukrzycowej poprzez indukcję produkcji VEGF i IL-6 w komórkach mezangium, podocytach, perocytach, ciele szklistym [283 – 286]. W badaniach doświadczalnych i klinicznych stwierdzono, iż inhibitory ACE obniżają poziom VEGF w nerkach i narządzie wzroku zwierząt, ale nie hamują postępu nefropatii i retinopatii, jedynie go spowalniają [287-291]. Autorzy tych prac sugerują, iż miejscowa

produkcja angiotensyny II w nerkach i narządzie wzroku u pacjentów z cukrzycą typu 1, szczególnie z niedostatecznym wyrównaniem metabolicznym, może być częściowo niezależna od stosowanych inhibitorów ACE. W prezentowanej pracy, w trakcie leczenia inhibitorami ACE, wartości poziomu TNF- α i VEGF oraz badanych enzymów w czasie 4-letniej obserwacji wzrastały, a poziom IL-10, IL-12 obniżał się i nie różnił się istotnie od poziomu tych parametrów u dzieci z cukrzycą typu 1 nie będących poddanych terapii ACE-I, u których w czasie 4-letnich badań doszło do progresji choroby w kierunku mikroalbuminurii. Wydaje się więc, iż dalsze badania dotyczące zastosowania inhibitorów ACE u pacjentów z cukrzycą typu 1 na wczesnym etapie nefropatii cukrzycowej, jeszcze przed rozwojem mikroalbuminurii, ale z podwyższonym poziomem enzymu NAG i jego izoenzymów oraz cytokin TNF- α , VEGF, a także obniżonym stężeniem IL-10, IL-12 być może pozwolą na ustalenie, kiedy należy rozpocząć leczenie inhibitorami ACE oraz określić korzyści płynące z tej terapii.

Wyniki badań w prezentowanej pracy oraz doniesienia innych autorów pozwalają spojrzeć szerzej na patogenezę nefropatii i retinopatii cukrzycowej. Założenie, że jest ona konsekwencją toczącego się przewlekłego procesu zapalnego daje nowe możliwości terapeutyczne. Fakt, udokumentowany przeze mnie i wielu innych autorów, iż TNF- α i VEGF mogą być spośród badanych parametrów istotnymi wskaźnikami uszkodzenia funkcji nerek i narządu wzroku jeszcze przed pojawieniem się mikroalbuminurii, być może ujawni kierunek nowego pomysłu terapeutycznego opóźniającego wystąpienie powikłań w przebiegu cukrzycy typu 1.

Być może wczesne stosowanie antagonistów TNF- α i VEGF u pacjentów z cukrzycą typu 1, u których stwierdza się wysoką aktywność tych cytokin, pozwoli na uniknięcie powikłań w postaci nefropatii i retinopatii cukrzycowej. W fazie badań klinicznych jest zastosowanie przeciwciał neutralizujących VEGF [292 – 294], inhibitorów receptora dla VEGF (VEGFR1) [295 – 297] oraz antagonistów TNF- α [298 – 300]. Podejmowane są również próby mające na celu niedopuszczenie do tworzenia się AGEs [301], zmniejszenie ich wpływu na komórki docelowe [302] oraz rozrywanie wiązań krzyżowych pomiędzy już istniejącymi AGEs [303]. Ponadto w ciągu ostatnich lat prowadzone są kliniczne próby wprowadzenia IL-10 do terapii przeciwzapalnej w różnych chorobach, w których występuje niedobór tej cytokiny [304 – 305]. Prowadzenie dal-

szych badań oceniających negatywny wpływ niedoboru IL-10 na postęp rozwoju mikroangiopatii cukrzycowej u chorych na cukrzycę typu 1 w pierwszych latach choroby być może pozwoli na zastosowanie w przyszłości terapii wzmagającej poziom tej cytokiny.

Ostatecznym celem wszystkich tych prowadzonych badań jest poszukiwanie zarówno wczesnych wskaźników rozwijających się powikłań, których identyfikacja może przyczynić się do poznania ich patogenezy, jak i poszukiwania nowych propozycji terapeutycznych, które poprawią komfort życia chorych na cukrzycę typu 1. Pewnym wkładem w ten program diagnostyczno-terapeutyczny są wnioski jakie sformułowano w oparciu o przeprowadzone badania własne.

6. WNIOSKI

1. Mikroalbuminuria wydaje się być późnym, nieodwracalnym objawem nefropatii cukrzycowej.
2. Podwyższony poziom cytokin TNF- α , VEGF w surowicy krwi u dzieci z przewlekłe trwającą cukrzycą typu 1 może modulować odpowiedź zapalną i mieć wpływ na rozwój nefropatii i retinopatii cukrzycowej u dzieci.
3. Pojawienie się wykrywalnego TNF- α w surowicy krwi u dzieci z cukrzycą typu 1, ale jeszcze bez klinicznie jawnych objawów retinopatii cukrzycowej i mikroalbuminurii wraz ze wzrostem aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów zarówno w surowicy krwi i w moczu sygnalizują, iż proces zapalny w narządzie wzroku oraz w nerkach może toczyć się już w pierwszych latach trwania choroby.
4. W pierwszym i drugim stadium nefropatii cukrzycowej prawdopodobnie najpierw dochodzi do uszkodzenia nabłonka kanalikula proksymalnego nerki, a następnie do powstania zmian patologicznych w błonie podstawnej kłębuszka nerkowego.
5. Badanie enzymu NAG w moczu u dzieci z cukrzycą typu 1 wydaje się wcześniejszym markerem prognostycznym rozwoju nefropatii niż oznaczenie poziomu cystatyny C, ale monitorowanie poziomu cystatyny C może pomóc w przewidywaniu rozwoju mikroalbuminurii.
6. Istotny związek pomiędzy VEGF, TNF- α , IL-12, IL-10, HbA1c u dzieci z cukrzycą typu 1 wskazuje, iż powstanie i rozwój zmian naczyniowych w obrębie nerek i narządu wzroku w przebiegu choroby, nie jest wynikiem działania jednego czynnika, ale zespołu czynników współdziałających ze sobą.

-
7. Oznaczenie poziomu IL-6 w surowicy krwi i w moczu u dzieci z cukrzycą typu 1 odzwierciedla raczej późny objaw zapalenia, ale zestawienie go z wczesnymi markerami ryzyka powikłań może być przydatne jako wspomagający parametr diagnostyczny do oceny stopnia zaawansowania zmian w nerkach i narządzie wzroku.
 8. Utrzymujący się niski poziom TNF- α i VEGF oraz narastający poziom IL-10 i IL-12 w pierwszych latach cukrzycy typu 1 wskazuje, iż taki układ wartości może odgrywać ochronną rolę przed rozwojem nefropatii i retinopatii cukrzycowej u dzieci.

7. STRESZCZENIE

Celem pracy było poszukiwanie wczesnych markerów rozwoju nefropatii i retinopatii u dzieci z cukrzycą typu 1 oraz określenie ich wartości prognostycznych. Cel pracy realizowano poprzez: ocenę związku pomiędzy poziomem enzymu N-acetylo- β -D-glukozaminidazy, cystatyny C a rozwojem mikroalbuminurii i zmian w narządzie wzroku u dzieci z cukrzycą typu 1, analizę zależności pomiędzy stopniem wyrównania metabolicznego (HbA1c), poziomem naczyniowego czynnika wzrostu śródbłónka (VEGF), czynnika martwicy nowotworu (TNF- α), interleukiny 6 (IL-6) a rozwojem nefropatii i retinopatii cukrzycowej u dzieci, ocenę wpływu anti-angiogennej IL-12 i antyzapalnej IL-10 na rozwój nefropatii i retinopatii cukrzycowej u dzieci oraz określenie, który z badanych czynników immunologicznych i biochemicznych można uznać za prognostyczny dla ujawnienia się mikroalbuminurii i zmian w narządzie wzroku w przebiegu cukrzycy typu 1 u dzieci.

Badania przeprowadzono 2- krotnie w odstępie 4 lat, w 2003 i 2007 roku w grupie 185 dzieci (95 dziewcząt i 90 chłopców) z rozpoznaniem cukrzycy typu 1. Grupę kontrolną stanowiło 86 zdrowych dzieci (52 dziewcząt i 34 chłopców) w porównywalnym wieku do pacjentów z rozpoznaniem cukrzycy typu 1. Kryterium wykluczenia z badań pacjentów z rozpoznaniem cukrzycy było współistnienie innych chorób o podłożu autoimmunologicznym.

U wszystkich pacjentów i zdrowych dzieci oznaczono poziom hemoglobiny glikozyłowanej (HbA1c), CRP, cholesterolu całkowitego, jego frakcji LDL- i HDL-cholesterolu, trójglicerydów, C-peptydu, kreatyniny, cystatyny C, dobowego wydalania albumin w moczu. Ponadto oznaczono poziom aktywności w moczu i w surowicy krwi enzymu NAG i jego izoenzymów A i B metodą kolorymetryczną oraz poziom tumor necrosis factor (TNF- α), interleukiny 6 (IL-6), naczyniowego czynnika wzrostu śródbłónka (VEGF), interleukiny 10 (IL-10), interleukiny 12 (IL-12) w surowicy krwi i IL-6 w moczu metodą immunoenzymatyczną (ELISA). U każdego pacjenta wykonano również całodobowy pomiar ciśnienia tętniczego oraz badanie okulistyczne.

W początkowym etapie prezentowanej pracy wykazano, iż grupa dzieci z cukrzycą typu 1 i z udokumentowaną mikroalbuminurią charakteryzowały się statystycznie znacmiennym wyższym poziomem wydalania albumin w moczu ($p < 0,001$), istotnie wyż-

szym poziomem cystatyny C ($p < 0,001$) oraz istotnie wyższą aktywnością enzymu NAG i jego izoenzymów A i B w moczu ($p < 0,001$) w porównaniu do grupy dzieci zdrowych. Natomiast dokonując oceny porównawczej grupy pacjentów bez udokumentowanej mikroalbuminurii z grupą dzieci zdrowych istotne różnice wykazano tylko w zakresie aktywności enzymu NAG i jego izoenzymów ($p < 0,001$), natomiast nie wykazano statystycznie znamiennych różnic w zakresie cystatyny C. Wyniki te sugerują, iż badanie enzymu NAG w moczu u dzieci z cukrzycą typu 1 jest wcześniejszym markerem prognostycznym rozwoju mikroalbuminurii, niż oznaczenie poziomu cystatyny C oraz w pierwszych latach choroby najpierw dochodzi do uszkodzenia nabłonka kanalików proksymalnego nerki, a następnie do powstania zmian patologicznych w błonie podstawnej kłębuszka nerkowego. Stwierdzono, iż u dzieci z cukrzycą typu 1, poziom enzymu NAG – $27,67 \pm 8,37$ U/g kreat., izoenzymu A – $21,93 \pm 7,24$ U/g kreat. oraz izoenzymu B – $5,74 \pm 2,23$ U/g kreat. na początku badania, może predysponować po kilku latach trwania choroby do rozwoju mikroalbuminurii. Natomiast istotnie niższe wartości aktywności enzymu NAG – $13,74 \pm 6,46$ U/g kreat., izoenzymu A – $9,73 \pm 4,01$ U/g kreat. oraz izoenzymu B – $3,58 \pm 1,64$ U/g kreat. na początku badania wskazują, iż u znacznej części dzieci z cukrzycą w tym czasie nie doszło jeszcze do uszkodzenia błony podstawnej nabłonka kanalików proksymalnego i prawdopodobnie nie zostały jeszcze zapoczątkowane procesy patologiczne w obrębie kłębuszka nerkowego. W tej grupie dzieci z cukrzycą typu 1, po 4 latach obserwacji nie udokumentowano mikroalbuminurii. Analizując czas trwania choroby wykazano najwyższe stężenie cystatyny C w grupie dzieci chorujących na cukrzycę typu 1 powyżej 10 lat. Natomiast śledząc poziom wydalania albumin w moczu u poszczególnych pacjentów przez 4 lata obserwacji stwierdzono, iż dzieci z cukrzycą i z progresją choroby w kierunku mikroalbuminurii, wykazywały istotnie wyższe wartości poziomu cystatyny C na początku badania, niż pacjenci w tym samym czasie, u których nie udokumentowano mikroalbuminurii zarówno na początku i na końcu badania ($0,88 \pm 0,16$ vs $0,58 \pm 0,19$; $p = 0,013$).

W dotychczasowych opublikowanych pracach własnych wykazałam statystycznie znamienno wyższy poziom TNF- α zarówno w grupie pacjentów z mikroalbuminurią, jak i bez objawów nefropatii cukrzycowej w porównaniu do grupy dzieci zdrowych oraz istotną dodatnią korelację pomiędzy poziomem tej cytokiny a aktywnością enzymu NAG

w moczu w grupie dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1, jak i długotrwałą cukrzycą typu 1. W prezentowanej pracy, 4-letni okres badań pozwolił zasugerować wartości prognostyczne poziomu TNF- α ryzyka rozwoju mikroalbuminurii. Stwierdzono, iż u dzieci z cukrzycą typu 1 z wyjściowym poziomem TNF- α w surowicy krwi – 3,51 (0,00-10,40) pg/ml i aktywnością izoenzymu B w moczu – $5,74 \pm 2,23$ U//g kreat. rozwinęła się po 4 latach obserwacji mikroalbuminuria. Ponadto stwierdzono, iż tylko 17% pacjentów spośród badanej grupy nie wykazywało aktywności tej cytokiny na początku badania.

W dalszej części pracy analiza porównawcza poziomów VEGF w surowicy krwi poszczególnych grup badanych pacjentów w zależności od historii rozwoju mikroalbuminurii wykazała, iż poziom cytokiny 470,81 (217,29 – 926,47) pg/ml na początku badania był związany z rozwojem po 4 latach jawnej nefropatii cukrzycowej.

W prezentowanej pracy analiza regresji logistycznej wykazała, iż poziom HbA1c spośród badanych czynników miał największy wpływ na ryzyko rozwoju retinopatii nieproliferacyjnej w badanej grupie dzieci z cukrzycą typu 1. Ponadto badając wpływ wybranych cytokin na rozwój retinopatii cukrzycowej wykazano istotnie wyższy poziom TNF- α , VEGF w surowicy krwi u dzieci z cukrzycą typu 1 bez udokumentowanych zmian w naczyniu wzroku, ale z podwyższoną aktywnością enzymu NAG i jego izoenzymu A w surowicy krwi w porównaniu z dziećmi zdrowymi. Progresja choroby w kierunku retinopatii cukrzycowej wiązała się z dalszym wzrostem poziomu HbA1c oraz wzmożeniem sekrecji VEGF, TNF- α do surowicy krwi, jak również ze wzrostem aktywności enzymu NAG. Wykazana w niniejszej pracy, istotna dodatnia korelacja, pomiędzy poziomem HbA1c a poziomem VEGF ($R=0,20$; $p=0,007$, $R=0,48$; $p<0,001$), TNF- α ($R=0,19$; $p=0,009$; $R=0,37$, $p<0,001$) w surowicy krwi, zarówno na początku w 2003 roku, jak i na końcu badania w 2007 roku, potwierdza znaczący wpływ kontroli glikemii na wydzielanie czynników prozapalnych u dzieci z cukrzycą typu 1. Tym bardziej, że udokumentowana siła tych korelacji istotnie wzrosła po 4 latach prowadzonych badań.

Dalsza analiza regresji logistycznej wykazała, iż kolejno VEGF oraz TNF- α były istotnymi czynnikami biorącym udział w rozwoju retinopatii cukrzycowej. Dodatnia statystycznie znamienna korelacja między VEGF ($R=0,54$; $p<0,001$; $R=0,71$; $p<0,001$) a TNF- α potwierdza istotny współudział obu cytokin w procesie zapalnym u dzieci z

cukrzycą typu 1. Z kolei analiza korelacji pomiędzy TNF- α i VEGF a enzymem NAG i jego izoenzymem A i B, wykazała istotną, narastającą w czasie choroby zależność między poziomami tych cytokin a aktywnością enzymatyczną NAG w surowicy krwi. Wyniki 4-letnich badań pozwoliły na sprecyzowanie wartości badanych cytokin oraz enzymu NAG, które z jednej strony mogą odzwierciedlać stopień zaawansowania toczących się procesów zapalnych u pacjentów z cukrzycą typu 1, z drugiej zaś strony, mogą też określić stopień ryzyka rozwoju retinopatii i nefropatii cukrzycowej u poszczególnych chorych. Poziom TNF- α – 0,53 (0,00 – 4,6) pg/ml, VEGF 159,53 (13,45 – 731,5) pg/ml, enzymu NAG – $25,67 \pm 9,89$ U/l, jego izoenzymu A – $19,37 \pm 8,33$ U/l oraz izoenzymu B – $6,18 \pm 2,89$ U/l w surowicy krwi stwierdzony na początku badania u dzieci z cukrzycą typu 1, nie wiązał się w czasie 4-letniej obserwacji z rozwojem objawów klinicznych retinopatii i nefropatii cukrzycowej.

W prezentowanej pracy wykazano istotną ujemną korelację zarówno na początku, jak i na końcu badania między poziomem IL-10 a poziomem HbA1c, TNF- α , VEGF, enzymu NAG w surowicy krwi oraz enzymu NAG w moczu. Ponadto zaobserwowano, iż siła tych korelacji rosła wraz z czasem trwania choroby. Stwierdzono, iż u dzieci z cukrzycą typu 1 z wyjściowym poziomem IL-10 w surowicy krwi – 0,91 (0,00 – 4,40) pg/ml rozwinęła się po 4 latach obserwacji mikroalbuminuria. Ponadto w niniejszej pracy analiza regresji logistycznej wykazała istotny wpływ niedoboru IL-12 u dzieci z cukrzycą typu 1 na ryzyko rozwoju mikroalbuminurii i zmian w narządzie wzroku.

Stwierdzony w obecnej pracy istotny związek pomiędzy VEGF, TNF- α , IL-12, IL-10, HbA1c u dzieci z cukrzycą typu 1 wskazuje, iż powstanie i rozwój zmian naczyniowych w obrębie nerek i narządu wzroku w przebiegu choroby, nie jest wynikiem działania jednego czynnika, ale zespołu czynników współdziałających ze sobą.

W prezentowanych badaniach stwierdzono, iż u dzieci z cukrzycą typu 1, utrzymujący się niski poziom TNF- α [0,53 (0,00 – 4,6) vs 0,86 (0,00 – 5,1)] i VEGF 159,53 [(13,45 – 731,5) vs 199,78 (19,34 – 540,23)] oraz narastający poziom IL-10 [2,11 (0,00 – 14,8) vs 3,30 (0,00 – 19,20)] i IL-12 [2,45 (0,00 – 18,8) vs 2,92 (0,00 – 13,2)] przez cały okres 4-letnich badań wiązał się z łagodnym przebiegiem choroby oraz nieujawnianiem się w tym okresie objawów nefropatii i retinopatii cukrzycowej.

8. SUMMARY

The study aimed at identification of early markers of diabetic nephropathy and retinopathy development along with assessment of their putative prognostic significance in children diagnosed with Diabetes mellitus type 1. The aim of the work was realized through: the analysis of the correlation between N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) enzyme and Cystatin C levels against the incidence of microalbuminuria and damage to the eye apparatus in children with Diabetes mellitus type 1; the analysis of the association between metabolic compliance (HbA1c), levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and the incidence of diabetic nephropathy and retinopathy in children; the assessment of the influence of anti-angiogenic IL-12 and anti-inflammatory IL-10 on the incidence of diabetic nephropathy and retinopathy in children; and finally the identification of the immunologic and biochemical markers of prognostic significance in detection of microalbuminuria and damage to the eye apparatus in the course of Diabetes mellitus type 1 in children.

185 patients (95 girls and 90 boys) diagnosed with Diabetes mellitus type 1 were enrolled in the study. Control group consisted of 86 healthy children (52 girls and 34 boys) representing comparable age groups. Children underwent detailed clinical, biochemical and immunological examinations twice at the distance of 4 years: in 2003 and 2007. Diabetic patients who had a concomitant autoimmune disorder were excluded from the study.

All the patients and healthy children had glycosylated hemoglobin (HbA1c), CRP, total cholesterol and its LDL and HDL fractions, C-peptide, creatinine, Cystatin C levels and 24hrs urinary albumin secretion measured. Moreover serum and urine activity of NAG and its A and B isoforms were measured by means of a colorimetric method. Serum levels of tumor necrosis factor (TNF- α), vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin 10 (IL-10), interleukin 12 (IL-12) and urine level of interleukin 6 (IL-6) were measured by means of an immunoenzymatic assay (ELISA). All the patients had also 24hrs observation of arterial blood pressure and underwent ophthalmologic examination.

At the initial stage of the study it was demonstrated that the group of diabetic children who presented with documented microalbuminuria was characterized by a statistically significant higher rate of urinary albumin secretion ($p < 0.001$), significantly elevated level of Cystatin C ($p < 0.001$) and significantly higher urinary activity of NAG enzyme and its A and B isoforms as compared with the healthy children. At the same time the group of patients presenting without microalbuminuria differed from healthy controls only in the activity of NAG and its A and B isoforms ($p < 0.001$), whilst no statistically significant differences were observed with regard to Cystatin C levels. In view of the above it appears that measurement of NAG enzyme activity in urine in children diagnosed with Diabetes mellitus type 1 is an earlier prognostic marker of the development of microalbuminuria as compared with the Cystatin C measurement. Our results further suggest that during first years of the disease initially damage to the epithelium of the renal proximal tubules occurs, which is later followed by the incidence of pathologic changes in the basal membrane of the renal glomerule. It has been observed that the measured at the beginning of the study urine levels of NAG enzyme = 27.67 ± 8.37 U/g cr., of the isoform A = 21.93 ± 7.24 U/g cr. and of the isoform B = 5.74 ± 2.23 U/g cr. may predispose to the development of microalbuminuria. In contrast, lower values of the urine activity of NAG = 13.74 ± 6.46 U/g cr., of the isoform A = 9.73 ± 4.01 U/g cr. and of the isoform B = 3.58 ± 1.64 U/g cr. measured at the beginning of the study imply that in the majority of these diabetic children no damage to the basal membrane of the proximal tubules has yet occurred and that probably pathologic processes thus far did not affect renal glomeruli. None of the patients belonging to this group developed microalbuminuria after four years of observation. Highest Cystatin C levels were observed in patients who were over 10 years from disease diagnosis. The analysis of the urinary albumin secretion rate in individual patients over four years of clinical observation revealed that diabetic patients who progressed to develop microalbuminuria had statistically significant higher Cystatin C levels at the beginning of the study in comparison with the patients who neither at the beginning nor after four years of the study had a documented microalbuminuria (0.88 ± 0.16 vs 0.58 ± 0.19 ; $p = 0.013$).

In my previously published studies I have shown statistically significant higher levels of TNF- α in diabetic patients presenting with microalbuminuria as well as in those

without signs of diabetic nephropathy in relation to healthy control group of children. Additionally, a statistically significant positive correlation between serum level of this cytokine and NAG urine activity both in the group patients with de-novo Diabetes mellitus type 1 and those with long-standing Diabetes mellitus type 1 was observed. In the current study, on the account of comprehensive 4-years long observation of the diabetic patients, I was able to propose values of TNF- α prognostic for microalbuminuria development. Children, who at the beginning of the study had serum TNF- α level of 3.51 (0.00 – 10.40) pg/ml and NAG isoform B urine activity of 5.74 ± 2.23 U/g cr, after four years of observation developed microalbuminuria. Moreover, only 17% of patients from the examined group had undetectable activity of this cytokine at the beginning of the study.

In the next phase of the study a comparison analysis of the VEGF serum levels in relation to microalbuminuria development was performed in individual patients. VEGF level of 470.81 (217.29 – 926.47) pg/ml measured at the beginning of the study was found to be associated with development of overt diabetic nephropathy after four years of clinical observation.

Logistic regression analysis of the data collected in the present study has shown that, among all the analyzed factors, HbA1c level had strongest impact on the development of non-proliferative retinopathy in the examined group of children with Diabetes mellitus type 1. Additionally, from the analysis of the influence of the selected cytokines on the development diabetic retinopathy it emerges that significantly higher levels of TNF- α and VEGF are present in the serum of children diagnosed with Diabetes mellitus type 1 who have no documented damage to the eye apparatus, but have an increased activity of NAG and its A isoform in serum as compared with healthy controls. Disease progression towards diabetic retinopathy was associated with further increase in HbA1c level as well as intensification of secretion of TNF- α and VEGF to the blood serum along with increase in NAG enzyme activity. The identified in the presented work statistically significant positive correlation between HbA1c and serum levels of VEGF ($R=0.20$; $p=0.007$, $R=0.48$; $p<0.001$) and TNF- α ($R=0.19$; $p=0.009$; $R=0.37$, $p<0.001$), that was observed both at the beginning of the study in 2003 and also at its end in 2007, confirms the fundamental effect of metabolic compliance on the secretion

of pro-inflammatory factors in children with Diabetes mellitus type 1. What is more, the strength of the observed correlations increased significantly after four years of the study.

Further analysis of the results of logistic regression has shown that TNF- α and VEGF were important factors participating in the process of diabetic retinopathy development. Positive, statistically significant correlation between VEGF ($R=0.54$; $p<0.001$; $R=0.71$; $p<0.001$) and TNF- α confirms notable contribution of the two cytokines to the inflammatory process present in children with Diabetes mellitus type 1. More to the point, the analysis of the correlation between TNF- α , VEGF and the activity of the NAG and its A and B isoforms provided evidence for the significant, augmenting with the duration of the disease, association between serum levels of these cytokines and enzymatic activity of NAG in blood serum. The results of four years long clinical observation of the patients allowed specifying values of the analyzed cytokines and NAG enzyme that apart from reflecting the advancement of the pro-inflammatory processes may also be useful in assessing the risk of diabetic nephropathy and retinopathy development. The levels of: TNF- α = 0.53 (0.00 – 4.6) pg/ml, VEGF = 159.3 (13.45 – 731.5) pg/ml, NAG enzyme = 25.67 ± 9.89 U/l, its A isoform = 19.37 ± 8.33 U/l and its B isoform = 6.18 ± 2.89 U/l in blood serum measured at the beginning of the study in children with Diabetes mellitus type 1 were not associated with the development of clinical symptoms of diabetic nephropathy and retinopathy during four years of observation.

In the present work a statistically significant negative correlation between the level of IL-10 and the levels of HbA1c, TNF- α , VEGF and serum and urine NAG activities, both at the beginning of the study and after four years of clinical observation, was observed. More to the point, the strength of the correlation increased with the duration of the disease. Diabetic children who presented with the serum IL-10 level of 0.91 (0.00 – 4.40) pg/ml at the beginning of the study, after four years of the study developed microalbuminuria. Additionally, logistic regression analysis performed using the data collected in the present study showed significant impact of IL-12 deficiency in children with Diabetes mellitus type 1 on the risk of microalbuminuria development and incidence of the damage to the eye apparatus.

The identified in the present report statistically significant association between VEGF, TNF- α , IL-12, IL-10, HbA1c in children with Diabetes mellitus type 1 indicates that the occurrence and progression of vascular lesions in kidney and eye in the course of the disease result from interaction of multiple factors working together and are not an effect of a single-acting parameter.

In the current study it has been shown that in children diagnosed with Diabetes mellitus type 1 persistent low levels of TNF- α [0.53 (0.00 – 4.6) vs 0.86 (0.00 – 5.1)] and VEGF [159.53 (13.45 – 731.5) vs 199.78 (19.34 – 540.23)] along with augmenting levels of IL-10 [2.11 (0.00 – 14.8) vs 3.30 (0.00 – 19.20)] and IL-12 [2.45 (0.00 – 18.8) vs 2.92 (0.00 – 13.2)] throughout entire, four years long, period of the study was associated with benign clinical course of the disease and absence of any of the signs of diabetic nephropathy and retinopathy.

9. PIŚMIENNICTWO

1. King H, Rewers M. WHO Ad Hoc Diabetes Reporting Group: Global estimates for prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance in adults. *Diabetes Care* 1993; 16: 157-177.
2. Silink M. Childhood Diabetes: A Global Perspective- *Pediatric Diabetes* 2005; 6(suppl. 3).
3. Zimmet P, Alberti KMM, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414: 782-787.
4. Jarosz-Chobot P, Otto-Buczkowska E, Polańska J. Epidemiologia cukrzycy typu 1 w populacji rozwojowej: aktualne trendy i czynniki ryzyka. *Przegląd Pediatryczny* 2003; 33(2): 128-132.
5. Jarosz-Chobot P, Krętowski A, Peczyńska J, Bandurska-Stankiewicz E, Urban M, Rewers M. The parallel increase of type 1 diabetes in two different regions of Poland: highly industrialized Upper Silesia and agricultural north-eastern region of Podlasie and Warmia-Mazury (1989-2003). *Przegląd Lekarski* 2006; 63 (supl. 4): 31.
6. Myśliwiec M, Balcerska A, Zorena K, Jędrzejczyk A, Malinowska E, Myśliwska J. Increasing Incidence of Diabetes Mellitus Type 1 in Children- the Role of Environmental Factors. *Polish Journal of Environmental Studies* 2007; Vol.16,1: 109-112.
7. Myśliwiec M, Balcerska A, Bautembach-Minkowska J, Małecki M.T, Nazim J. Zastosowanie osobistej pompy insulinowej u 7 tygodniowego niemowlęcia z cukrzycą noworodkową. *Endokrynologia, Diabetologia i Choroby Przemiany Materii Wieków Rozwojowych* 2006; 12, 4: 296-299.
8. Wahlberg J, Fredriksson J, Nikolic E, Vaarala O, Ludvigsson J, The ABIS-Study Group. Environmental factors related to the induction of beta-cell autoantibodies in 1-yr-old healthy children. *Pediatric Diabetes* 2005, 6: 199-205.
9. Krętowski A, Kinalska I. Geny DQA1 i DQB1 jako markery cukrzycy insulinozależnej w populacji polskiej. *Pol Arch Med Wewn* 1999; CI: 205.
10. Hermann R, Bartsocas CS, Soltesz G et al. Genetic screening for individuals at high risk for type 1 diabetes in the general population using HLA Class II alleles as disease markers. A comparison between three European populations with variable rates of disease incidence. *Diabetes Metab Res* 2004; 20: 322-329.

11. Greenbaum CJ, Eisenbarth G, Atkinson M et al. DPT-1 Study Group. High frequency of abnormal glucose tolerance in DQA1* 0102/DQB1* 0602 relative identified s part of the DPT-1. *Diabetologia* 2005; 48: 68-74.
12. Gillespie KM, Bain SC, Barnett AH et al. The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes. *Lancet* 2004; 364: 1699-1700.
13. Walter M, Albert E, Conrad M et al. IDDM2/insulin VNTR modifies risk conferred by IDDM1/HLA for development of Type 1 diabetes and associated autoimmunity. *Diabetologia* 2003; 46: 712-720.
14. Kavvoura FK, Ioannidis JP. CTLA-4 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Type 1 Diabetes Mellitus: A HuGE Review and Meta-Analysis. *Am J Epidemiol* 2005; 162: 3-16.
15. Hulme JS, Barratt BJ, Twells RC et al. Association analysis of the lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK) gene in type 1 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 2479-2482.
16. Li M, Guo D, Isales CM et al. SUMO wrestling with type 1 diabetes. *J Mol Med* 2005; 83: 504-513.
17. Morahan G, Huang D, Ymer SI et al. Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL-12B allele. *Nat Genet* 2001; 27: 218-221.
18. Knip M, Akerblom HK. Environmental factors in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Exp Clin End Diab* 1999; 107: 93-100.
19. Viskari H, Ludvigsson J, Uibo R et al. Relationship between the incidence of type 1 diabetes and maternal enterovirus antibodies: time trends and geographical variation. *Diabetologia* 2005; 48: 1280-1287.
20. Frisk G, Tuvemo T. Enterovirus infection with beta-cell tropic strains are frequently in siblings of children diagnosed with type 1 diabetes and in association with elevated levels of GAD65 antibodies. *J Med Virol* 2004; 73: 450-459.
21. Honeyman MC, Coulson BS, Stone NL et al. Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes* 2000; 49: 1319-1324.
22. Couper JJ, Steele C, Beresford S et al. Lack of association between duration of breastfeeding or introduction of cow's milk and development of islet autoimmunity. *Diabetes* 1999; 48: 2145-2149.
23. Ziegler AG, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated auto-antibodies. *JAMA* 2003; 290: 1721-1728.

24. Virtanen SM, Knip M. Nutritional risk predictors of beta cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age. *Am J Clin Nutr* 2003;78(6): 1053-1067.
25. Bellisle F, Dalix AM, Chappuis AS, Rossi F, Fiquet P, Gaudin V, Assoun M, Slama G. Monosodium glutamate affects mealtime food selection in diabetic patients. *Appetite* 1996; 26(3): 267-275.
26. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes. *Cell Biochem Biophys* 2007; 48(2-3): 159-163.
27. Myśliwiec M, Balcerska A, Zorena K, Kamińska H, Myśliwska J. Proinflammatory cytokines and markers of kidney damage in children with newly diagnosed diabetes mellitus type 1. *Central European Journal of Immunology* 2005; 30 suppl.1: 77-78.
28. Hanifi-Moghaddam P, Schloot NC, Kappler S, Seibler J, Kolb H. An association of autoantibody status and serum cytokine levels in type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 1137-1142.
29. Rapport MJ, Bistrizter T, Aharoni D, Weiss M et al. TH1/TH2 cytokine secretion of first degree relatives of T1DM patients. *Cytokine* 2005; 30(5): 219-227.
30. Almawi WY, Tamim H, Azar ST. T helper 1 and 2 cytokines mediate the onset and progression of type 1 (insulin-dependent) diabetes. *JCEM* 1999; 84: 1497-1502.
31. Szelachowska M, Krętowski A, Kinalska I. Decreased in vitro IL-4 and IL-10 production by peripheral blood in first degree relatives at high risk of diabetes type 1. *Horm Metab Res* 1998; 30: 526-530.
32. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon W. Cytokines and their roles in pancreatic islet β -cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 1139-1149.
33. Szelachowska M, Krętowski A, Kinalska I. Increased in vitro IL-12 production by peripheral blood in high-risk IDDM first degree relatives. *Horm Metab Res* 1997; 29: 168-171.
34. Schram M.T, Chaturvedi N, Schalkwijk C et al. EURODIAB Prospective Complications Study Group: Markers of Inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes. The EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia* 2005; 48: 370-378.
35. Królewski AS, Warram JH, Christlieb AR, Busick EJ, Kahn CR. The changing natural history of nephropathy in type 1 diabetes. *Am J Med* 1985; 78: 785-794.
36. Viberti G.C., Walker J.D., Pinto J. Diabetic nephropathy. W: *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Chichester 1997, 1267-1328.

37. Warram JH, Gearin G, Laffel L, Królewski AS. Effect of duration of type 1 diabetes on the prevalence of stages of diabetic nephropathy defined by urinary albumin/creatinine ratio. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 930-937.
38. Hasslacher C. Natural course of diabetic nephropathy W: C. Hasslacher (red.). *Diabetic nephropathy*. John Wiley & Sons, Nowy York, USA 2001: 19-37.
39. Puka J, Rutkowski B, Lichodziejewska-Niemierko M i wsp. Raport o stanie leczenia nerkozastępczego w Polsce – 2001. Gdańsk 2002.
40. Śnit M, Dwornicki M, Żukowska-Szczechowska E, Grzeszczak W. Przeżywalność chorych w podeszłym wieku cierpiących z powodu cukrzycy i przewlekłej niewydolności nerek leczonych dializami. *Diab Dośw Klin* 2002; 2: 237-241.
41. USRD. Annual Data Report 2000. National Institutes of Health, National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Disease. Bethesda, MD, 2000.
42. Watts GF, Tonb N, Gant V et al. The immunogenetics of early nephropathy in insulin-dependent diabetes: association between the HLA-2 antigen and albuminuria. *Q J Med* 1992; 83: 461-471.
43. Saucha W, Grzeszczak W, Skwarna B. Polimorfizm genu endoteliny-1 i receptora endoteliny typu A a rozwój nefropatii u chorych na cukrzycę typu 2.
44. Grzeszczak W. Znaczenie czynników genetycznych w patogenezie nefropatii cukrzycowej. [w:] *Nefropatia cukrzycowa*. W: Grzeszczak. Via Media, Gdańsk 2003: 47-68.
45. Fujisawa T, Okegami H, Kawaguchi J, Hamada Y, Uceda H et al. Meta-analysis of association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin I-converting enzyme gene with diabetic nephropathy and retinopathy. *Diabetologia* 1998; 41: 47-53.
46. Zanchi A, Wantman M, Moczulski DK, Warram JH. Genetic susceptibility to diabetic nephropathy in IDDM is related to polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene. *Diabetes* 1998; 47: 52-57.
47. McKnight AJ, Savage DA, Patterson CC, Doherty CC, Maxwell AP. Role of transforming growth factor 1 gene polymorphisms un diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 1: 216-220.
48. Poirier O, Nicaud V, Vionnet N, Raoux S, Tarnov L, Vlassara H. Polymorphism screening of four genes encoding advanced glycation and-product putative receptors. Association study with nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 2001; 50: 1214-1218.
49. Hodgkinson AD, Millward BA, Demaine AG. Polymorphisms of the glucose transporter (GLUT1) gene are associated with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2001; 59: 985-989.

50. Messent JW, Elliot TG, Hill RD, Jarrett RJ, Keen H, Viberti GC. Prognostic significance of microalbuminuria in insulin-dependent diabetes mellitus: A twenty-three year follow-up study. *Kidney Int* 1992; 41: 836-839.
51. Giorgio F, Laviola L, Cavallo-Perin P et al. Factors associated with progression to macroalbuminuria in microalbuminuric type 1 diabetic patients: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia* 2004; 47: 1020-1025.
52. Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E. The stages in diabetic renal disease with emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes* 1983; 28: 6-11.
53. Parving HH, Mauer M, Ritz E. Diabetic nephropathy. W: B.M. Brenner (red.). Brenner and rector's the kidney. Philadelphia 2004: 1777-1818.
54. Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DE, Mauer M. Sequential renal biopsies in insulin-dependent diabetic patients: structural factors associated with clinical progression. *Kidney Int* 1995; 48: 1929-1935.
55. Drummond K, Mauer M. International Diabetic Nephropathy Study Group: The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: II. Early renal structural changes in type 1 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 1580-1587.
56. Kozłowska K, Wysocka J, Janicka K. Przydatność diagnostyczna oznaczania cystatyny C. *Przegl Lek* 2001; 58: 524-529.
57. Oddo C, Morange S, Portugal H et al. Cystatin C is not more sensitive than creatinine for detecting early renal impairment in patients with diabetes. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: 310-315.
58. Randers E, Krue S, Erlandsen EJ et al. Reference interval for serum cystatin C in children. *Clin Chem* 1999; 45: 1856-1861.
59. Erlandsen EJ, Randers E, Kristensen JH. Evaluation of the Dade Behring N Latex Cystatin C assay on the Dade Behring Nephelometer II System. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59: 1-6.
60. Cimerman N, Brguljan PM, Krasovec M, Suskovic S, Kos J. Twenty-four hour variations of cystatin C and total cysteine proteinase inhibitory activity in sera from healthy subjects. *Clin Chim Acta* 2000; 291: 89-95.
61. Coll E, Botey A, Alvarez L et al. Serum cystatin C as a new marker for noninvasive estimation of glomerular filtration rate and as a marker for early renal impairment. *Am J Kidney Dis* 2000; 36: 29-34.
62. Uzum H, Keles MO, Ataman R, Aydin R et al. Serum cystatin C level as a potentially good marker for impaired kidney function. *Clinical Biochemistry* 2005; 38: 792-798.

63. Mares J, Stejskal D, Vavrouskova J et al. Use of cystatin C determination in clinical diagnostics. *Biomed Papers* 2003; 147: 177-183.
64. Saito K, Shimizu A, Inoue S et al. Effective usage of nutrition assessment proteins in patients with diabetic nephropathy. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 2004; 46: 73-78.
65. Sarnak MJ, Katz R, Stehman-Breen CO et al. Cardiovascular Health Study: Cystatin C concentration as a risk factor for heart failure in older adults. *Ann Intern Med* 2005; 142: 497-505.
66. Tan GD, Lewis AV, James TJ, Altmann P et al. Clinical Usefulness of Cystatin C for the Estimation of Glomerular Filtration Rate in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25: 2004-2009.
67. Newman DJ. Cystatin C. *Am Clin Biochem* 2002; 39: 89-104.
68. Helin I, Axenram M, Grubb A. Serum cystatin C as a determinant of glomerular filtration rate in children. *Clin Nephrol* 1998; 49: 221-225.
69. Donaghue KC, Faichild JM, Craig ME et al. Do all orebubertal years of diabetes duration contribute to diabetes complications? *Diabetes Care* 2003; 26: 1224-1230.
70. Herget-Rosenthal S, Pietruck F, Volbracht L et al. Serum cystatin C: a superior marker of rapidly reduced glomerular filtration after uninephrectomy in kidney donors compared to creatinine. *Clin Nephrol* 2005; 64: 41-46.
71. Almy FS, Christopher MM, King DP, Brown SA. Evalution of cystatin C as an endogenous marker of glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Intern Med* 2002, 16, 45.
72. O'Riordan SE, Webb MC, Stowe HJ et al. Cystatin C improves the detection of mild renal dysfunction in older patients. *Am Clin Biochem* 2003; 40: 648-655.
73. Larsson A, Malm J, Grubb A, Hansson LO. Calculation of dlomerular filtration rate expressed in mL/min from plasma cystatin C values in mg/L. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64: 25.
74. Schuck O, Teplan V, Sibova J, Stollova M. Predicting the glomerular filtration rate from serum creatinine, serum cystatin C and the Cockcroft and Gault formula with regard to drug dosage adjustment. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004; 42: 93-98.
75. Mussap M, Vestra MD, Fioretto P et al. Cystatin C is a more sensitive marker than creatinine for the estimation of GFR in type 2 diabetic patients. *Kidney Int* 2002; 61: 1453-1461.
76. Filler G, Bökenkamp A, Hofmann W, Le Bricon T et al. Cystatin C as a marker of GFR- History, indications and future research. *Clin Biochem* 2005; 38: 1-8.

77. Demirtas S, Bozbas A, Akbay A, Yavuz Y, Karaca L. Diagnostic value of serum cystatin C for evaluation of hepatorenal syndrome. *Clin Chim Acta* 2001; 311: 81-89.
78. Donaghue RP, Stranges S, Rejman K, Rafelson LB et al. Elevated cystatin C concentration and progression to pre-diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 1724-1729.
79. Shlipak MG, Katz R, Sarnak MJ, et al. Cystatin C and prognosis for cardiovascular and kidney outcomes in elderly persons without chronic kidney disease. *Ann Intern Med* 2006; 145: 237-246.
80. Benöhr P, Grenz A, Hartmann JT, Müller GA, Blaschke S. Cystatin C-A Marker for Assessment of the Glomerular Filtration Rate in Patients with Cisplatin Chemotherapy. *Kidney Blood Press Res* 2006; 29: 32-35.
81. Peczyńska J, Urban M, Głowińska B, Florys B. Czy ocena stężenia cystatyny C u dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1 może być wczesnym markerem nefropatii cukrzycowej? *Endokrynologia, Diabetologia i Choroby Przemiany Materii Wieku Rozwojowego* 2005; 11,3,: 141-146.
82. Shimizu A, Horikoshi S, Rinno H, Kobata M et al. Serum cystatin C predict the early prognostic stages of patients with type 2 diabetic nephropathy. *J Clin Lab Anal* 2003; 17(5): 164-167.
83. Mona AK, Salem, Safinaz A. El-Habashy, Omayma M. Saeid et al. Urinary excretion of n-acetyl- β -D-glucosaminidase and retinol binding protein as alternative indicators of nephropathy in patients with type 1 diabetes mellitus. *Pediatric Diabetes* 2002; 3: 37-41.
84. Lorini R, Scaramuzza A, Cortona L, Valenti G et al. Increased urinary N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG) excretion in young insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 1995; 29(2): 99-105.
85. Hashimoto R, Adachi H, Nishida H, Tsuruta M, Nomura G. Serum N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in predicting the development of hypertension. *Hypertension* 1995; 25: 1311-1314.
86. Lapsley M, Flynn FV, Sansom PA. Beta-2-glycoprotein-1 (apolipoprotein-H) excretion and renal tubular malfunction in diabetic patients without clinical proteinuria. *J Clin Pathol* 1993; 46: 465-469.
87. Waikar SS, Bonventre JV. Biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16: 557-564.
88. Zhou Y, Vaiday VS. Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury and chromium. *Toxicol Sci* 2008 101(1): 159-170.

89. Myśliwiec M, Balcerska A, Kamińska H, Nowacka M et al. Rola N-acetylo-beta-D-glukozaminidazy (NAG) oraz izoenzymów A i B oznaczonych w surowicy krwi i w moczu we wczesnej diagnostyce nefropatii cukrzycowej – część I. *Diabetologia Polska* 2000; 7,3: 171-178.
90. Myśliwiec M, Balcerska A, Kamińska H, Nowacka M et al. Rola N-acetylo-beta-D-glukozaminidazy (NAG) oraz izoenzymów A i B oznaczonych w surowicy krwi i w moczu we wczesnej diagnostyce nefropatii cukrzycowej – część II. *Diabetologia Polska* 2000; 7,3: 171-178.
91. Myśliwiec M, Balcerska A, Zorena K. Badanie aktywności N-acetylo-beta-D-glukozaminidazy (NAG) oraz izoenzymów A i B oznaczonych w surowicy krwi i w moczu jako wczesne wskaźniki rozwoju zmian naczyniowych w przebiegu cukrzycy typu 1 u dzieci. *Nefrol Dial Pol* 2004; 8,2: 60-65.
92. Klein R, Moss SE, Klein BEK. Is gross proteinuria a risk factor for the incidence of proliferative diabetic retinopathy? *Ophthalmology* 1993; 100: 1140-1146.
93. Rossing P, Hougaard P, Parving HH. Risk Factors for Development of Incipient and Overt Diabetic Nephropathy in Type 1 Diabetic Patients. *Diabetes Care* 2002; 25,5: 859-864.
94. Sochett E, Daneman D. Early diabetes –related complications in children and adolescents with type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999; 28: 865-881.
95. Danne T, Kordonouri O, Endres I, Hovener G. Monitoring for retinopathy in children and adolescents with type 1 diabetes. *Acta Paediatr* 1998; 425: 35-41.
96. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Focal photocoagulation treatment of diabetic macular edema. Relationship of treatment effect to fluorescein angiographic and other retinal characteristics at baseline: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report Number 19. *Arch Ophthalmol* 1995; 113: 1144-1155.
97. Cruickshanks KJ, Vadheim CM, Moss SE et al. Genetic marker associations with proliferative retinopathy in persons diagnosed with diabetes before 30 yr of age. *Diabetes* 1992; 41: 879-885.
98. Awata T, Inoue K, Kurihara S et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 1635-1639.
99. Ray D, Mishra M, Ralph S, Read ?I, Davies R, Brenchley P. Association of the VEGF gene with proliferative diabetic retinopathy but not proteinuria in diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 861-864.

100. Hudson BI, Stickland MH, Futers TS, Grant PJ. Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes* 2001; 50: 1505-1511.
101. Kao YL, Donaghue K, Chan A, Knight J, Silnik M. An aldose reductase intragenic polymorphism associated with diabetic retinopathy, *Diabetes Res Clin Pract* 1999; 46: 155-160.
102. Rabensteiner D, Abrahamian H, Irisgler K et al. ACE gene polymorphism and proliferative retinopathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22: 1530-1535.
103. Warpeha KM, Ah-Fat F, Harding S et al. Dinucleotide repeat polymorphisms in EDN1 and NOS3 are not associated with severe diabetic retinopathy in type 1 or type 2 diabetes. *Eye* 1999; 13: 174-178.
104. Kamiuchi K, Hasegawa G, Obayashi H et al. Intercellular adhesion molecule-1 [ICAM] polymorphism is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2002; 19: 371-376.
105. Kański J. *Okulistyka kliniczna*. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 1997: 344-351.
106. Stephenson J, Fuller JH, Viberti GC. The EURODIAB IDDM Complications Study Group: blood pressure, retinopathy and urinary albumin excretion in IDDM. *Diabetologia* 1995; 38: 599-603.
107. Service FJ, O'Brien PC. The relation of glycaemia to the risk of development and progression of retinopathy in the Diabetic Control and Complications Trial. *Diabetologia* 2001; 44: 1215-1220.
108. Zhang L, Krzentowski G, Albert A, Lefebvre PJ. Risk of developing retinopathy in diabetes control and complications trial type 1 diabetic patients with good or poor metabolic control. *Diabetes Care* 2001; 23: 1275-1279.
109. Wang PH, Lau J, Chalmers TC. Meta-analysis of effects of intensive blood glucose control on late complications of type 1 diabetes. *Lancet* 1993; 341: 1306-1309.
110. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986.
111. Rudberg S, Osterby R. Diabetic glomerulopathy in young IDDM patients. *Horm Res* 1998; 50: 17-22.

112. DCCT Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986.
113. Tore JB, Knut DJ, Jes TC, Hans JB, Peter AT, Kristian FH. The advanced glycation end-product N-(carboxymethyl) lysine is increased in serum from children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21: 1997-2002.
114. Hammes HP, Wellensiek B, Kloting et al. The relationship of glycaemic level to advanced glycation end-product (AGE) accumulation and retinal pathology in the spontaneous diabetic hamster. *Diabetologia* 1998; 41(2): 165-170.
115. Hughes SJ, Wall N, Scholfield CN et al. Advanced glycation endproduct modified basement membrane attenuates endothelin-1 induced $[Ca^{2+}]$ signaling and contraction in retinal microvascular pericytes. *Molecular Vision* 2004; 10: 996-1004.
116. Stitt AW, Li YM, Gardiner TA, Bucola R, Arche DB et al. Advanced glycation end products (AGEs) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-onfused rats. *Am J Pathol* 1997; 150: 523-531.
117. Cruz CI, Ziyadeh FN, Isono M, Kouahou M, Han DC et al. Effects of high glucose and TGF- β 1 on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney International* 2002; 62: 901-913.
118. Lu M, Kuroki M, Amano S, Tolentino M, Keough K, Kim I et al. Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J Clin Invest* 1998; 101(6): 1219-1224.
119. Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S et al. Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human cultured mesangial cells. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 20309-20315.
120. Chiarelli F, Spagnoli A, Basciani F. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in children, adolescents and young adults with type 1 diabetes mellitus: relation to glycaemic control and microvascular complications. *Diabet Med* 2000; 17: 650.
121. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews* 2004; 25: 581-611.
122. Murata T, Nagai R, Ishibashi T, Inomata H, Ikeda K, Horiuchi S. The relationship between accumulation of advanced glycation endproducts and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. *Diabetologia* 1997; 40: 764-769.

-
123. Tilton RG, Kawamura T, Chang KC, Ido Y et al. Vascular dysfunction induced by elevated glucose levels in rats is mediated by vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest.* 1997; 99(9): 2192-2202.
 124. Schliegemann R, van Hinsberg V. Role of vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor in eye disease. *Br J Ophthalmol* 1997; 81: 501-512.
 125. Benjamin L. Glucose, VEGF-A and diabetic complications. *Am J Pathol* 2001; 158:1181-1184.
 126. Ferrara N, Davis-Smyth T. The Biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
 127. Villegas G, Lange-Sperandio B, Tufro A. Autocrine and paracrine functions of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 2005; 67: 449-457.
 128. Thomas KA. Vascular endothelial growth factor a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996; 271: 603-606.
 129. Detmar M, Brown LF, Klaffey KP, Yeo KT et al. Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptor in psoriasis. *J Exp Med* 1994; 180: 1141-1146.
 130. Azza MO, Abdel-Rahman, Sally AF, El-Sahrigy et al. A comparative study of two angiogenic factors: vascular endothelial growth factor and angiogenic in induced sputum from asthmatic children in acute attack. *Chest* 2006; 129: 266-271.
 131. Henry TD, Annex BH, McKendall GR et al. The VIVA Trial; Vascular Endothelial growth factor in ischemia for vascular angiogenesis. *Circulation* 2003; 107: 1359-1365.
 132. Chen ZJ, Yang YB, Huang SM. Expression of VEGF in kidney of diabetic rats. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2007; 38(4): 633-636.
 133. Peczyńska J, Urban M, Urban B, Głowińska B. Ocena stężenia endotelialnego czynnika wzrostu naczyń u dzieci i młodzieży chorującej na cukrzycę typu 1. *Pol Merk Lek* 2004. 95: 438-442.
 134. Kim NH, Oh JH, Seo JA, Lee KW et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble VEGF receptor FLT-1 in diabetic nephropathy. *Kidney International* 2005; 67: 167-177.
 135. Albert & Jakobiec. Mechanisms of Intraocular Neovascularization. W: Principles and Practice of Ophthalmology: Clinical Practice. 2nd edition, W. Saunders Company 2000.
 136. Smith G, McLeod D, Foreman D Immunolocalisation of the VEGF receptors FLT-1, KDR and FLT-4 in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 486-494.

137. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cadiovasc Res.* 2005; 65: 550-563.
138. Tilton RG, Chang KC, LeJeune WS, Stephan CC, Brock TA et al. Role for nitric oxide in the hyperpermeability and hemodynamic changes induced by intravenous VEGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 689-696.
139. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: 1358-1366.
140. Okada S, Shikata K, Matsuda M, Ogawa S et al. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are resistant against renal injury after induction of diabetes. *Diabetes* 2003; 52:: 2586-2593.
141. Reinders MEJ, Sho M, Izawa A. Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity. *J Clin Invest* 2003; 112: 1655-1665.
142. Jain RK, Carmeliet PF. Vessels of death or life. *Sci Am* 2001; 285: 38-45.
143. Kanesaki Y, Suzuki D, Uehara G, Toyoda M, Katoh T et al. Vascular endothelial growth factor gene expression is correlated with glomerular neovascularization in human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2005; 45(2): 288-294.
144. Cha DR, Kang YS, Han SY, Jee YH et al. Vascular endothelial growth factor is increased during early stage of diabetic nephropathy in type II diabetic rats. *Journal of Endocrinology* 2004; 183: 183-194.
145. Kim NH, Kim KB, Kim LD, Kim SG, Choi KM et al. Plasma and urinary vascular endothelial growth factor and diabetic nephropathy in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 2004; 21: 545-551.
146. Myśliwiec M, Balcerska A, Zorena K, Myśliwska J, Lipowski P, Raczynska K. The role of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2008; 79: 141-146.
147. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES. Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor in human retina and choroids. *Ophthalmology* 1996; 103: 1820-1828.
148. Schlegelmann R, van Hinsberg V. Role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in eye disease. *Br J Ophthalmol* 1997; 81: 501-512.
149. Schramm MT, Chaturvedi N, Schalkwijk CG, Fuller JH, Stehouwer CDA, EURODIAB Prospective Complications Study Group: markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes-the EURODIAB Prospective Complications Study: *Diabetologia* 2005; 48: 370-378.

150. van Hecke MV, Dekker JM, Nijpels G et al. Inflammation and endothelial dysfunction are associated with retinopathy: the Hoorn Study. *Diabetologia* 2005; 48: 1300-1306.
151. Myśliwiec M, Zorena K, Balcerska A, Myśliwska J, Lipowski P, Raczyński K. The activity of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and tumor necrosis factor-alpha at early stage of diabetic retinopathy development in type 1 diabetes mellitus children. *Clinical Biochemistry* 2006; 39: 851-856.
152. Myśliwiec M, Balcerska A, Zorena K, Myśliwska J, Nowacka M, Lipowski P, Raczyńska K. Wybrane czynniki immunologiczne i biochemiczne ryzyka rozwoju retinopatii i nefropatii cukrzycowej u dzieci z cukrzycą typu 1. *Endokrynologia, Diabetologia i Choroby Przemiany Materii Wieku Rozwojowego* 2006; 12,4: 269-273.
153. Benjamin L. Glucose, VEGF-A and diabetic complications. *Am J Pathol* 2001; 158: 1181-1184.
154. Hernandez C, Burgos R, Canton A, Garcia-Arumi J, Segura RM, Simo R. Vitreous levels of vascular cell adhesion molecule and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy: a case-control study. *Diabetes Care* 2001; 24(3): 516-521.
155. Yoo SA, Bae DG, Ryoo JW, Kim HR, Park GS, Cho CS, Chae CB, Kim WU. Arginine-Rich Anti-Vascular Endothelial Growth Factor (Anti-VEGF) Hexapeptide Inhibits Collagen-Induced Arthritis and VEGF-Stimulated Productions of TNF and IL-6 by Human Monocytes. *J Immuno* 2005; 174: 5846-5855.
156. He J, Haskins K. Pathogenicity of T helper 2 T-cell clones from T-cell receptor transgenic non-obese diabetic mice is determined by tumor necrosis factor-alpha. *Immunology* 2008; 123(1): 108-117.
157. Doganay S, Evereklioglu C, Turkoz ERH, Sevinc A, Mehmet N, Savli H. Comparison of serum NO, TNF α , IL-1 β , IL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Eye* 2002; 16: 163-170.
158. Nakamura T, Fukui M, Ebihara I, Osada S, Nagaoka I, Tomino Y, Koide H. mRNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. *Diabetes* 1993; 42: 450-456.
159. Pankewycz OG, Guan JX, Benedict JF. Cytokines as mediators of autoimmune diabetes and diabetic complications. *Endocr Rev* 1995; 16: 164-176.
160. Myśliwiec M, Zorena K, Balcerska A, Myśliwska J. Does tumor necrosis factor- α precede occurrence of microalbuminuria In type 1 diabetes mellitus children? *Journal of the Polish Diabetological Association* 2006; 6,3: 131-136.

161. Vlassara H Recent progress in advanced glycation and products and diabetic complications. *Diabetes* 1997; 46: 19-25.
162. Hang L, Krzentowski GM, Albert A. Risk of developing retinopathy in Diabetes Control and Complications Trial type 1 diabetic patients with good or poor metabolic control. *Diabetes Care* 2001; 24: 1275-1279.
163. Myśliwiec M, Balcerska A, Zorena K, Kamińska H, Nowacka M, Sibińska Ż, Wiśniewski P, Myśliwska J. Relationship Between the Level of TNF- α , IL-6 and Risk of Renal Proximal Tubules damage in Children with Newly Diagnosed Diabetes Mellitus Type 1. *Polish Journal of Environmental Studies* 2005; 14: 292-295.
164. Chatterjee PK, Hawksworth GM, McLay JS. Cytokine-stimulated nitric oxide production in the human renal proximal tubule and its modulation by natriuretic peptides: A novel immunomodulatory mechanism? *Exp Nephrol* 1999; 7: 438-448.
165. Markewitz BA, Michael JR, Kohan DE. Cytokine-induced expression of a nitric oxide synthase in rat renal tubule cells. *J Clin Invest* 1993; 91: 2138-2143.
166. Takeuchi M, Keino H, Kezuka T, Usui M, Taguchi O. Immune responses to retinal self antigens in CD25(+)CD(+) regulatory T-cell-depleted mice; *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 1879-1886.
167. Kitching AR, Katerelos M, Mugde SJ, Tiping PG, Power DA, Holdsworth SR. Interleukin-10 inhibits experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol* 2002; 128: 36-43.
168. Choi YK, Kim YJ, Park HS, Choi K, Paik SG, Lee YI, Park JG. Suppression of glomerulosclerosis by adenovirus mediated IL-10 expression in the kidney. *Gene Ther* 2002; 10: 559-568.
169. Noble KE, Harkness D, Yong KL. Interleukin 10 regulates cellular responses in monocyte/endothelial cell co-cultures. *Br J Haematol* 2000; 108(3): 497-504.
170. Szelachowska M, Krętowski A, Kinalska I. Increased in vitro interleukin 12 production by peripheral blood in high-risk IDDM first degree relatives. *Horm Metab Res* 1997; 29: 168-171.
171. Głowacka E, Banasik M, Lewkowicz P, Tchórzewski H. The effect of LPS on neutrophils from patients with high risk of type 1 diabetes mellitus in relation to IL-8, IL-10 and IL-12 production and apoptosis in vitro. *Scand J Immunol* 2002; 2: 210-217.
172. Trinchieri G. Biological properties and therapeutic applications of interleukin-12. *Eur Cytokine Netw* 1997; 8: 305-307.

-
173. Kang BY, Kim TS. Targeting cytokines of the interleukin-12 family in autoimmunity. *Curr Med Chem* 2006; 10: 1149-1156.
 174. Rothe H, Burkart V, Faust A, Kolb H. Interleukin 12 gene expression is associated with rapid development of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 1996; 39: 112-122.
 175. Joosten LAB, Lubberts E, Helsen MMA, Van den Berg WB. Dual role of IL-12 in early and late stages of murine collagen type II arthritis. *J Immunol* 1997; 159: 4094-4102.
 176. Duda DG, Sunamura Ł, Lozonschi T, Kodana S, Egawa G et al. Direct in vitro evidence and in vivo analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12. *Cancer Res* 2000; 60: 1111-1118.
 177. Ghiringhelli F, Menard C, Martin F, Zitvogel L. The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression. *Immunol Rev* 2006; 214: 229-238.
 178. Colombo MP, Trinchieri G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 155-168.
 179. Zorena K, Myśliwska J, Myśliwiec M, Balcerska A, Lipowski P, Raczynska K. Interleukin 12 jako mediator antyangiogeny u dzieci z cukrzycą typu 1. *Pediatr Endocrinol Diab Metab* 2007; 13,1: 27-31.
 180. Skopiński P, Barcz E, Szaflik J, Lipińska A, Sommer E et al. Angiogenic activity and IL-12 p40 concentration in healthy people and diabetes patients sera. *Central European Journal of Immunology* 2006; 1-2.
 181. Zorena K, Myśliwska J, Myśliwiec M, Balcerska A, Lipowski P, Raczynska K. Interleukin 12 and Tumor Necrosis Factor- α equilibrium is prerequisite for clinical course free from late complications in type 1 diabetes mellitus children. *Scandinavian Journal Immunology* 2008; 67: 204-208.
 182. American Diabetes Association: Diagnosis and Classification of Diabetes. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183-1197 and *Diabetes Care* 2003; 26: 3160-3167.
 183. Mogensen CE, Keane WF, Bunnett PH. Prevention of diabetic renal disease with special reference to microalbuminuria. *Lancet* 1995; 346: 1080-1084.
 184. Ganz M, Proetzsch R, Hasslacher C. Screening for and diagnosis of incipient diabetic nephropathy (IDN) in diabetes. W: C. Hasslacher (red.). *Diabetic nephropathy*. John Wiley & Sons, Nowy York, USA 2001: 117-127.
 185. American Diabetes Association: Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care* 2004; supl. 1: 79-83.

186. Wyszyńska T, Litwin M. Nadciśnienie tętnicze u dzieci i młodzieży. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002; 46.
187. ETDRS Report No 11. Classification of diabetic retinopathy from fluorescein angiograms ETDRS Rerearch Group. *Ophthalmology* 1991; 98: 807-822.
188. Myśliwiec M, Balcerska A, Stępiński J, Bąkowska A, Jędrzejczyk A i wsp. Czynniki prognostyczne choroby trzewnej u dzieci z cukrzycą typu 1. *Endokrynologia, Diabetologia i Choroby Przemiany Materii Wieku Rozwojowego* 2006; 12, 4: 281-285.
189. Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK et al. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of vascular Disease i Diabetes. *Diabetologia* 2001; 44: 14-19.
190. Giorgio F, Laviola L, Cavallo-Perin P et al. Factors associated with progresion to macroalbuminuria in microalbuminuric type 1 diabetic patients: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia* 2004; 47: 1220-1229.
191. Messent JW, Elliot TG, Hill RD, Jarrett RJ, Keen H, Viberti GC. Prognostic significance of microalbuminuria in insulin-dependent diabetes mellitus. A twenty-three year follow-up study. *Kidney Int* 1992; 41: 836-839.
192. Urban B. Zmiany okulistyczne u dzieci i młodzieży z cukrzycą insulinozależną. *Klinika Pediatria* 2006; 14,1: 67-71.
193. Wagram JH, Scott LJ, Hanna LS et al. Progression of microalbuminuria to proteinuria In type 1 diabetes nonlinear relationship with hyperglycemia. *Diabetes* 2000; 49: 94-101.
194. Hovind P, Tarnow L, Rossing P, Jensen BR et al. Predictors of the development of microalbuminuria and macroalbuminuria in patients with type 1 diabetes: inception cohort study. *BMJ* 2004; 328: 1105-1108.
195. Chaturvedi N, Bandinelli S, Mangili R, Penno G et al. Microalbuminuria in type 1 diabetes: race, risk factor and glycemic treshold. *Kidney Int* 2001; 60: 219-227.
196. Florys B, Ołdytowska A, Głowińska B i wsp. Występowanie powikłań przewlekłych w cukrzycy typu 1 u dzieci i młodzieży w zależności od metody insulinoterapii. *Endokrynologia Diabetologia i Choroby Przemiany Materii Wieku Rozwojowego* 2004; 10: 31-39.
197. Klein R, Zimman B, Gardiner R et al. The relationship of diabetic retinopathy to preclinical diabetic glomerulopathy lesions In type 1 diabetic patients. *Renin-Angiotensin System Study*. *Diabetes* 2005; 54: 527-533.
198. Peczyńska J, Urban B, Rybak-Krawczuk M, Urban M i wsp. Analiza czynników ryzyka zmian w narządzie wzroku u dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1. *Endokrynologia Diabetologia i Choroby Przemiany Materii Wieku Rozwojowego* 1997; 3: 23-27.

-
199. Głąb E, Wąsikowi R, Iwanicka Z. Występowanie nefropatii i retinopatii cukrzycowej u pacjentów do 30 roku życia z cukrzycą typu 1. *Diabetologia Polska* 2000; 7: 156-164.
 200. Mirkiewicz-Sieradzka B. Retinopatia cukrzycowa. [w:] *Przewlekłe powikłania cukrzycy*. Wyd. 2. J. Sieradzki (red.), Fund. Rozwoju Diagn. Labor., Kraków 1998, 93-138.
 201. Kolberg CE, Abrahamsson M, Arnqvist HJ, Finnstrom K, Ludvigsson J. Prevalence of retinopathy differs with age at onset of diabetes in a population of patients with 1 diabetes. *Diabet Med* 2002; 19: 924-931.
 202. Donaghue KC, Fairchild JM, Craig ME, Chan AK et al. Do all prepubertal years of diabetes duration contribute equally to diabetes complications. *Diabetes Care* 2003; 26: 1224-1229.
 203. Svensson M, Eriksson JW, Dahlquist G et al. Early glycemic control age at onset and development of microvascular complications in childhood-onset type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 955-962.
 204. Hadjadj S, Duly-Bouhanick B, Bekherras A, Bridoux F et al. Serum triglycerides are a predictive factor for the development and the progression of renal and retinal complications in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Metab* 2004; 30: 43-51.
 205. Lyons TJ, Jenkins AJ, Zheng D, Lackland DT, McGee D et al. Diabetic retinopathy and serum lipoprotein subclasses in the DCCT/EDIC cohort. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 910-918.
 206. Morind P, Rossing P, Toronow Ł, Parving HH. Progression of diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2001; 59: 702-709.
 207. Jenkins AJ, Lyons TJ, Zheng D, Otvos JD, Lackland DT et al. Lipoprotein in the DCCT/EDIC cohort: association with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2003; 64: 817-828.
 208. American Diabetes Association: Management of dyslipidemia in children and adolescents with diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 2194-2201.
 209. Głowińska B, Urban M, Koput A et al. Ocena stężenia lipoproteiny(A), apolipoproteiny A-1 oraz apolipoproteiny B u dzieci i młodzieży chorych na cukrzycę typu 1. *Diabetol Pol* 1998; 5: 288-296.
 210. Pać-Kożuchowska E, Szewczyk L, Witkowski D. Zachowanie się stężeń lipidów, lipoprotein i apolipoprotein w surowicy krwi u dzieci z cukrzycą typu 1. *Endokrynologia Diabetologia i Choroby Przemiany Materii Wieku Rozwojowego* 2002; 8: 23-27.
 211. Suchacka-Bianga M, Deja G, Jarosz-Chobot P, Tendera-Małecka E i wsp. Ocena wybranych czynników ryzyka miażdżycy u dzieci z cukrzycą typu 1 i hipercholesterolemią. En-

- dokrynologia Diabetologia i Choroby Przemiany Materii Wiek Rozwojowego. 2006; 12,1: 25-30.
212. Willems D, Dorych H. Lipoproteid and apolipoprotein levels in young insulin-dependent diabetic patients. Relations with glycosylated hemoglobin and fructosamine. *Presse Med* 1990; 1: 17-23.
213. Orchard TJ, Forrest KYZ, Kuller LH, Becker DJ. Lipid and blood pressure treatment goals for type 1 diabetes: 10-year incidence data from the Pittsburdh Epidemiology of Diabetes Complication study. *Diabetes Care* 2001; 24: 1053-1060.
214. Idzior-Waluś B, Mattock MB, Solnica B, Stevens Ł, Fuller JH. Factors associated with plasma lipids and lipoproteins in type 1 diabetes mellitus: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabet Med* 2001; 18: 786-796.
215. Jankowska A, Horodnicka Józwa A, Walczak M, Petriczko E I wsp. Ocena wybranych parametrów gospodarki lipidowej u dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1. *Endokrynologia Pediatria* 2007; 1(18): 33-39.
216. Głowińska-Olszewska B, Urban M, Peczyńska J, Koput A. Białko hsCRP u dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1. *Endokrynologia Diabetologia i Choroby Przemiany Materii Wiek Rozwojowego*. 2007, 13,2: 79-84.
217. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure In choldren and adolescents. *Pediatrics* 2004; 114: 555-576.
218. Szadkowska A, Pietrzak I, Mianowska B, Czerniawska E et al. Stan przednadcisnieniwy u dzieci i młodzieży chorej na cukrzycę typu 1. *Endokrynologia Diabetologia i Choroby Przemiany Materii Wiek Rozwojowego* 2006; 12,4: 286-291.
219. Lipińska A, Liszewska-Pfeifer D, Korczak D, Świtka E i wsp. Ocena stężenia w surowicy rozpuszczalnych form cząsteczek adhezyjnych u chorych z cukrzycą typu 1 powikłaną retinopatią. *Diabetologia Polska* 2006; 13(3-4): 135-139.
220. Kordonouri O, Danne T, Hopfenmüller W et al. Lipid profiles and blood pressure: are they risk factor fort he development of early background retinopathy and incipient nephropathy in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Paediatr* 1996; 85: 43-48.
221. Wolf G, Ziyadeh FN. Cellular and Molecular Mechanisms of Proteinuria in Diabetic Nephropathy. 2007; 106: 26-31.
222. Holmquist P, Torffvit O, Sjoblad S. Metabolic status in diabetes mellitus affects markers for glomerular filtration rate. *Pediatr Nephrol* 2003; 18: 536-562.

-
223. Knight EL, Verhave JC, Spiegelman D et al. Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement. *Kidney Int* 2004; 65: 1416-1422.
 224. Villa P, Jimerez M, Soriano MC et al. Serum cystatin C concentration as a marker of acute renal dysfunction in critically ill patients. *Crit Care* 2005; 9: 39-43.
 225. Delanaye P, Lambermont B, Chapelle JP et al. Plasmatic cystatin C for the estimation of glomerular filtration rate in intensive care units. *Intensive Care Med* 2004; 30: 980-983.
 226. Salem MA, El-Habashy SA, Saeid OM, El-Tawil MM et al. Urinary excretion of n-acetyl- β -D glucosaminidase and retinol binding protein as alternative indicators of nephropathy in patients with type 1 diabetes mellitus. *Pediatric Diabetes* 2002; 3: 37-41.
 227. Kordonouri O, Hartmann R, Müller Ch, Danne T, Weber B. Predictive Value of Tubular Markers for the Development of Microalbuminuria in Adolescents with Diabetes 1998; 50: 23-27.
 228. Abdel Shakour S, el-Hefnawy H, el-Yamani My, Azmi Y. Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in children with diabetes as an early marker of diabetic nephropathy. *Mediterr Health J* 2002; 8(1) 24-30.
 229. Ellis EN, Brouhard BH, Lagrone L, Trawis LB. Urinary excretion of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in children with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1983; 6: 251-255.
 230. Nakamura A, Suzuki T, Kohsaka T. Renal Tubular Function Modulates Urinary Levels of Interleukin-6. *Nephron* 1995; 70: 416-420.
 231. Sheena MC Gormley FC, William T, McBride, MD, Marilyn A, Armstrong DM, et al. Plasma and Urinary Cytokine Homeostasis and Renal Dysfunction during Cardiac Surgery. *Anesthesiology* 2000; 93: 1210-1216.
 232. Myśliwiec M, Balcerska A, Zorena k, Myśliwska J, Lipska B, Wisniewski P, Myśliwski A. Serum and Urinary Cytokine Homeostasis and Renal Tubular Function In Type 1 Diabetes Mellitus Children. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolizm* 2006; 19,12: 1421-1427.
 233. Kanellis J, Fraser S, Katerelos M, Power DA. Vascular endothelial growth factor is a survival factor for renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278; 905-915.
 234. Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S et al. Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte

- chemoattractant protein-1 in human cultured mesangial cells. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 20309-20315.
235. Senthil D, Choudhury GG, McLaurin C, Kasinath BS. Vascular endothelial growth factor induces protein synthesis in renal epithelial cells: a potential role in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2003; 64(2): 468-479.
236. Braun I, Kardon T, Reisz-Porszasz R, Banhegyi G & Mandl J. The regulation of the induction of vascular endothelial growth factor at the onset of diabetes in spontaneously diabetic rats. *Life Sciences* 2001; 2533-2542.
237. Cooper ME, Vranes D, Youssef S et al. Increased renal expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in experimental diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 2229-2239.
238. Hovind P, Tarnow I, Oestergaard PB, Parving HH. Elevated vascular endothelial growth factor in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Kidney International* 2000; 57: 56-61.
239. Peczyńska J, Urban M, Urban B, Głowińska B, Florys B. Ocena poziomu czynników wzrostowych u młodzieży z cukrzycą typu 1 i rozpoczynającą się angiopatią cukrzycową. *Endokrynologia Diabetologia i Choroby Przemiany Materii Wieku Rozwojowego* 2004; 10: 41-48.
240. Amin RH, Frank RN, Kennedy A, Elliott D, Pukli JE et al. Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 36-47.
241. Luttly GA, McLeod DS, Merges C, Diggs A, Plouet J. Localization of vascular endothelial growth factor in human retina and choroids. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 971-977.
242. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Chatzistefanou K et al. Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 964-970.
243. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331: 1480-1487.
244. Tolentino MJ, McLeod DS, Taomoto M, Otsuji T et al. Pathologic features of vascular endothelial growth factor-induced retinopathy in the nonhuman primate. *Am J Ophthalmol* 2002; 133: 373-385.

-
245. Shen WY, Lai CM, Graham CE et al. Long-term global retinal microvascular changes in a transgenic vascular endothelial growth factor mouse model. *Diabetologia* 2006; 49: 1690-1701.
 246. Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 66-71.
 247. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED et al. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 7,92: 10457-10461.
 248. Porta M, Sjoelie AK, Chaturvedi N et al. And the EURODIAB Prospective Complications Group: risk factor for progression to proliferative diabetic retinopathy in the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia* 2001; 44: 2203-2209.
 249. Sheetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA* 2002; 288: 2579-2588.
 250. Nishikawa T, Edelstein D, Du Liang X et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404: 787-790.
 251. Schram MT, Chatuverdi N, Schalkwijk C, Giorgino F, Ebeling P, Fuller JH, Stehouwer CD. The EURODIAB Prospective Study Group. Vascular risk factor and markers of endothelial function as determinants of inflammatory markers in Type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 2165-2173.
 252. Adamis AP. Is diabetic retinopathy an inflammatory disease? *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 463-465.
 253. Olson JA, White CM, Mc Hardy KC, Pearson DWM et al. Soluble leukocyte adhesion molecules in diabetic retinopathy stimulate retinal capillary endothelial cell migration. *Diabetologia* 2002; 40: 1166-1171.
 254. Cohen T, Nahari D, Cerem LW. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996; 271: 736-741.
 255. Goldstein IM, Ostwald P, Roth S. Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. *Vision Res* 1996; 36: 2979-2994.
 256. Moshage H. Nitric oxide determinations: much ado about NO-thing? *Clin Chem* 1997; 43: 553-556.
 257. Ohmori M, Harada K, Kitoh Y, Nagasaka S et al. The functions of circulatory polymorphonuclear leukocytes in diabetic patients with and without diabetic retinopathy. *Life Sci* 2000; 66: 1861-1870.

258. Agard CD, Agard E, Isacksson A. Association between urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase and its isoenzyme patterns and microangiopathy in type 1 diabetes mellitus. *Clin Chem* 1991; 37: 696-699.
259. Inoue T, Matsunaga R, Morooka S, Uehara Y. Serum N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity increases in association with insulin resistance in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2000; 149: 117-122.
260. Sekizuka K, Tomino Y, Sei C et al. Detection of serum IL-6 in patients with diabetic nephropathy. *Nephron* 1994; 68: 284-285.
261. Suzuki D, Miyazaki M, Naka R et al. In situ hybridization of interleukin 6 in diabetic nephropathy. *Diabetes* 1995; 44: 1233-1238.
262. Ihim CG, Park JK, Kim HJ, Lee TW, Cha DR. Effects of High Glucose on Interleukin-6 Production in Human Mesangial Cells. *J Korean Med Sci* 2002; 17: 208-212.
263. Funatsu H, Yamashita H, Ikeda T et al. Vitreous levels of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2003; 110: 1690-1696.
264. Funatsu H, Yamashita H, Noma H et al. Aqueous humor levels of cytokine are related to vitreous levels and progression of diabetic retinopathy in diabetic patients; *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005; 243: 3-8
265. Shimizu E, Funatsu H, Yamashita H et al. Plasma level of interleukin-6 is an indicator for predicting diabetic macular edema. *J Ophthalmol* 2002; 46: 78-83.
266. Danne T, Weber B, Hartmann R, Enders J et al. Long-term glycaemic control has a non-linear association to the frequency of background retinopathy in adolescents with type 1 diabetes. Follow-up of the Berlin Retinopathy Study. *Diabetes Care* 1994;17: 1390-1396.
267. Danne T, Kordonouri O, Hövener G, Weber B. Diabetic angiopathy in children. *Diabet Med* 1997; 14: 1012-1025.
268. Nowak JZ, Wiktorowska-Owczarek A. Neowaskularyzacja w tkankach oka: mechanizmy i rola czynników pro- i antyzapalnych. *Klinika Oczna* 2004; 106: 90-97.
269. Limb DA., Editorial: Interleukin-6. The endocrine cytokine. *The Journal Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000; 24: 1331-33.
270. Angiolillo AL, Sgadari C, Tosato G. A role for the interferon-inducible protein 10 in inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 31: 158-167.
271. Sgadari C, Angiolillo AL, Tosato G. Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood* 1996; 87: 3877-3882.

-
272. Voest EE, Kenyon BM, O'Reilly MS, Truitt G et al. Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 581-587.
 273. Davis GE, Allen KAP, Salazar R, Maxwell SA. Matrix metalloproteinase-1 and -9 activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices. *J Cell Sci* 2001; 114: 917-930.
 274. Perkins BA, Ficociello LH, Kristen MS, Silva H et al. Regression of Microalbuminuria in Type 1 Diabetes. *N Engl J Med* 2003; 348,23: 2285-2293.
 275. Microalbuminuria Collaborative Study Group, United Kingdom. Intensive therapy and progression to clinical albuminuria in patients with insulin dependent diabetes mellitus and microalbuminuria. *BMJ* 1995; 311: 973-977.
 276. Chaturvedi N, Fuller JH. Effect of intensive treatment in insulin dependent diabetes mellitus with microalbuminuria: sample size was too small. *BMJ* 1996; 312: 253-259.
 277. Giorgio F, Laviola L, Cavallo-Perin P et al. Factors associated with progresion to macroalbuminuria in microalbuminuria type 1 diabetic patients: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia* 2004; 47: 1020-1028.
 278. ACE Inhibitor in Diabetic Nephropathy Trialist Group: Should all patients with type 1 diabetes and microalbuminuria receive angiotensin-converting enzyme inhibitor? A meta-analysis of individual patient data. *Ann Intern Med* 2001; 134: 370-377.
 279. Arun CS, Stoddart J, Mackin P, MacLeod JM et al. Significance of Microalbuminuria in Long-Duration Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 2144-2149.
 280. Chiarelli F, Casani A, Verrotii A, Morgese G et al. Diabetic nephropathy in children and adolescents a critical review with particular reference to angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Acta Paediatr* 1998; 87: 42-45.
 281. Feld LG. Diabetic nephropathy. In: Barratt TM, Avner ED, Harmon WE, eds. *Pediatric Nephropathy*. Lippincott Wiliams & Wilkins, Baltimore 1999; 633-640.
 282. Klein R. Retinopathy and other ocular complications in diabetes. W: Ellenberg and Ryfkin's *Diabetes Mellitus*. Wyd. 6. Mc Graw-Hill, New York 2003: 663-695.
 283. Moriyama T, Fujibayashi M, Fujiwara Y, Kaneko T et al. Angiotensin II stimulates interleukin-6 release from cultured mouse mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6: 95-101.
 284. Chen S, Lee JS, Iglesias-de la Cruz MC, Wang A et al. Angiotensin II stimulates alpha3(IV) collagen production in mouse podocytes via TGF-beta and VEGF signaling implications for diabetic glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 1320-1328.

285. Williams B, Baker AQ, Gallacher B, Lodwick D. Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1995; 25: 913-917.
286. Otani A, Takagi H, Ott H et al. Angiotensin II-stimulated vascular endothelial growth factor expression in bovine retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 1192-1199.
287. Bui BV, Armitage JA, Tolcos M, Cooper ME, Vingrys AJ. ACE inhibition salvages the visual loss caused by diabetes. *Diabetol* 2003; 46: 401-408.
288. Dosso AA, Rungger-Brandle E, Leuenberger PM. Ultrastructural alterations in capillaries of the diabetic hypertensive rat retina: protective effects of ACE Inhibition. *Diabetol* 2004; 47: 1196-1201.
289. Xie XW, Zha O. The experimental study of captopril and valsartan on the preventing and treatment of diabetic retinopathy in diabetic mice. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2004; 40: 770-773.
290. Hogeboom Buggenum IM, Polak BC, Reicchert-Thoen JW et al. Angiotensin converting enzyme inhibiting therapy is associated with lower vitreous vascular endothelial growth factor concentrations in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2002; 45: 203-209.
291. Kakizawa H. Possible role of VEGF in the progression of kidney disease in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats: effects of an ACE inhibitor and an angiotensin II receptor antagonist. *Horm Metab Res* 2004; 36: 458-464.
292. De Vriese A, Tilton RG, Elger M, Stephan CC et al. Antibody against vascular endothelial growth factor improves early renal dysfunction in experimental diabetes. *Journal of American Society of Nephrology* 2001; 12: 993-1000.
293. Sudhakar A, Sugimoto H, Yang C, Lively J et al. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha, beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 4766-4771.
294. Yamamoto Y, Maeshima Y, Kitayama H, Kitamura S et al. Tymastin Peptide, an Inhibitor of Angiogenesis, Prevents Glomerular Hypertrophy in the Early Stage of Diabetic Nephropathy. *Diabetes* 2004; 53: 1831-1840.
295. Cai J, Ahmad S, Jiang WG, Huang J, Kontos CD, Boulton M, Ahmed A. Activation of vascular endothelial growth factor receptor-1 sustains angiogenesis and Bcl-2-expression via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in endothelial cells. *Diabetes* Dec 2003; 52: 2959-2968.

-
296. Soro-Paavonen A, Fobres JM. Novel therapeutics for diabetic micro- and macrovascular complications. *Curr Med Chem* 2006; 13: 1777-1788.
 297. Tremolada G, Lattanu R. The therapeutic potential of VEGF inhibition in diabetic microvascular complications. *Am J Cardiovasc Drugs* 2007; 7: 393-398.
 298. Migliore A, Massafra U, Carloni E, Padalino C et al. TNF-alpha blockade induce clinical remission in patients affected by polymyalgia rheumatica associated to diabetes mellitus and/or osteoporosis: a seven cases report. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 6: 373-378.
 299. Gonzalez-Gay MA, De Matias JM, Gonzalez-Juanatey C et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha blockade improves insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis 2006; 24: 83-86.
 300. Sfikalis PP, Markomichelakis N, Theodossiadis GP et al. Regression of sight-threatening macular edema in type 2 diabetes following treatment with the anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody infliximab. *Diabetes Care* 2005; 28: 445-447.
 301. Skolnick AA. Novel therapies to prevent diabetic retinopathy. *JAMA* 1997; 278:1480-1481.
 302. Clements RS, Robison WG, Cohen MP. Anti-glycated albumin therapy ameliorates early retinal microvascular pathology in db/db mice. *J Diabetes Complications* 1998; 12: 28-33.
 303. Takagi C, Bursell SE, Lin YW. Regulation of retinal hemodynamics in diabetic rats by increased expression and action of endothelin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 2504-2518.
 304. Kumar A, Zanotti S, Bunnell G, Habet K et al. Interleukin-10 blunts the human inflammatory response to lipopolysaccharide without affecting the cardiovascular response. *Crit Care Med* 2005; 33: 331-340.
 305. Asadullah K, Sabat R, Friedrich M, Volk HD, Steryy W. Interleukin-10: an important immunoregulatory cytokine with major impact on psoriasis. *Cur Drug Targets Inflamm Allergy* 2004; 3: 185-192.

10. ZAŁĄCZNIK

10.1. PODZIAŁ BADANYCH DZIECI Z CUKRZYCĄ TYPU 1 NA GRUPY

