

Glykace proteinů oční čočky u diabetiků a její neinvazivní měření – první zkušenosti v České republice

Jan Škrha jr, Jan Šoupal, Martin Prázný, Jan Škrha

III. interní klinika 1. LF UK a VFN Praha, přednosta prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc., MBA

Souhrn

Konečné produkty pokročilé glykace (AGEs) hrají významnou roli v patogenezi diabetu i diabetických komplikací. Jejich hromadění v oční čočce odráží celkový stav glykace v organismu. Nedávno byl na trh uveden nový konfokální biomikroskop ClearPath DS-120, který umožňuje rychlé a neinvazivní stanovení AGEs v oční čočce na základě autofluorescence (LAF) některých AGEs. V naší pilotní studii jsme vyšetřili LAF u 69 diabetiků a 49 zdravých kontrol a srovnali se současně měřenou kožní autofluorescencí (SAF) na předloktí pomocí AGE-Readeru. Bylo pozorováno významné zvýšení LAF (DM1T: $0,27 \pm 0,09$; DM2T: $0,22 \pm 0,06$; kontroly: $0,17 \pm 0,04$ AU; $p < 0,0001$) i SAF (DM1T: $2,0 \pm 0,4$; DM2T: $2,3 \pm 0,6$; kontroly: $1,8 \pm 0,3$ AU; $p < 0,0001$) u pacientů s diabetem oproti zdravým kontrolám. Ve všech skupinách byl popsán významný vztah mezi LAF a SAF (DM1T: $r = 0,53$; $p < 0,005$; DM2T: $r = 0,37$; $p < 0,05$; kontroly: $r = 0,30$; $p < 0,05$). Naopak závislost LAF ani SAF na HbA_{1c} nebyla přesvědčivá, což asi souvisí s tím, že hodnota glykovaného hemoglobinu dostatečně neodráží mnohaletý stav glykace v organismu. Stanovení oční autofluorescence možná přináší robustní marker dlouhodobé kompenzace diabetu predikující riziko budoucích komplikací, avšak definitivní potvrzení takové hypotézy si vyžádá četnější a delší klinické studie.

Klíčová slova: autofluorescence oční čočky – diabetes mellitus – glykace – hyperglykemie – konečné produkty pokročilé glykace – kožní autofluorescence

Glycation of lens proteins in diabetes and its non-invasive assessment – first experience in the Czech Republic

Summary

Advanced glycation end-products (AGEs) play a crucial role in the pathogenesis of diabetes and its complications. Their accumulation in the lens reflects total glycation rate in the human body. Recently, a new confocal biomicroscope ClearPath DS-120 quickly measuring lens autofluorescence (LAF) has been developed. Our pilot study included 69 patients with diabetes and 49 healthy controls, in all subject LAF was measured and compared with skin autofluorescence (SAF) assessed by AGE-Reader. Both LAF (T1DM: $0,27 \pm 0,09$; T2DM: $0,22 \pm 0,06$; controls: $0,17 \pm 0,04$ AU; $p < 0,0001$) and SAF (T1DM: $2,0 \pm 0,4$; T2DM: $2,3 \pm 0,6$; controls: $1,8 \pm 0,3$ AU; $p < 0,0001$) was significantly higher in patients with diabetes. In all groups significant relationship between LAF and SAF was observed (T1DM: $r = 0,53$, $p < 0,005$, T2DM: $r = 0,37$, $p < 0,05$; controls: $r = 0,30$, $p < 0,05$). On the contrary, LAF and SAF relationship with glycated hemoglobin (HbA_{1c}) was rather poor, since HbA_{1c} cannot wholly reflect long-term glycation process. Lens autofluorescence could be a robust marker of long-term diabetes control predicting future complication risks. However, confirmation of such hypothesis will need other and long-term clinical studies.

Key words: advanced glycation end-products – diabetes mellitus – glycation – hyperglycemia – lens autofluorescence – skin autofluorescence

Úvod

Již více než 100 let známe spontánní neenzymatický děj mezi redukcujícími sacharidy a proteiny nazývaný glykace. Tato reakce byla poprvé popsána Louis Camillem Maillardem, a nese tak dodnes jeho jméno [1]. Jedná se

o reakci relativně pomalou, která však u všech živých organismů dříve či později vede ke vzniku značně heterogenních molekul označovaných jako konečné produkty pokročilé glykace (advanced glycation endproducts – AGEs). Tuto reakci urychlují vyšší koncentrace

glukózy či dalších sacharidů, dikarboxyly (metylglyoxal či glyoxal), ale v některých tkáních i vyšší koncentrace kyseliny askorbové [2].

AGEs vznikají a negativně se uplatňují během fyziologického stárnutí, Alzheimerově chorobě, erektilní dysfunkci, ateroskleróze, při zánětlivých onemocněních či renální dysfunkci [3]. Nejvíce se však se zvýšenou akumulací AGEs setkáváme u diabetu, u nějž jsou považovány za jeden z hlavních faktorů rozvoje cévních změn, a to jak změn mikroangiopatických, tak makroangiopatických. Uplatňují se zde 3 základní patofyziologické mechanismy vlivu AGEs:

- akumulace AGEs v extracelulární matrix vedoucí k „zesíťování“ proteinů a snížené cévní elasticitě
- glykace intracelulárních proteinů měnící jejich funkci, a v neposlední řadě
- vazba AGEs na membránové receptory aktivující intracelulární kaskády modulující mj. genovou expresi [3].

Neméně významná je účast AGEs v samotné patogenezi diabetu. V posledních letech přibývá důkazů o tom, že konečné produkty glykace se podstatnou měrou podílejí na rozvoji inzulínové rezistence. Bylo popsáno několik mechanismů a o celé řadě dalších se spekuluje. Glykace inzulínu kupříkladu vede k jeho nižší účinnosti v cílových tkáních [4]. Rovněž bylo prokázáno, že vyšší koncentrace metylglyoxalu (prekurzoru AGEs) modifikují AMP kinázu, a tím zvyšují inzulínovou rezistenci v játrech [5].

Je tedy pochopitelné, že vliv AGEs v rozvoji diabetu i diabetických komplikací je komplexní a zasahuje více či méně všechny orgánové soustavy a nevyhýbá se ani oční čočce.

Glykace a autofluorescence oční čočky

Oční čočka je orgán zajišťující lom světelných paprsků na sítnici. K úplné funkci musí být čočka elastická a plně transparentní, což zajišťují komplikovaně organizované proteiny. Největší část proteinů čočky tvoří krystalliny, které jsou pomalu syntetizovány na periférii čočky a se stárnutím se přesouvají do jejího centra, v němž

tvoří jádro. Tam se také vyskytují pravděpodobně nejdéle „žijící“ proteiny lidského těla. Na rozdíl od okolních struktur obsahuje čočka mladého jedince nižší koncentraci kyslíku i glukózy [6,7]. V průběhu let však podléhá změnám, při kterých dochází ke kolorizaci a hromadění AGEs. První popsanou molekulou ze skupiny AGEs byl v roce 1986 karboxymetyllysin [8], postupně následovaly fluorescenční pentosidin či pyrrolin [9]. Do dnešního dne je známo více než 15 různých molekul AGEs, z nichž většina se vyskytuje právě v oční čočce. Zatímco některé AGEs mají spíše souvislost s rozvojem stařecké katarakty, jiné AGEs se výrazně uplatňují v rozvoji diabetických změn [10]. Do druhé skupiny patří i v posledních letech hojně studovaný glukosepan, významný marker diabetické mikroangiopatie [11].

Již bylo uváděno, mnohé AGEs mají fluorescenční vlastnosti, jež lze využít k jejich neinvazivnímu stanovení. Samotná autofluorescence čočky byla známa již v 1. polovině minulého století [12,13], ale až koncem 20. století bylo doloženo, že autofluorescence čočky (LAF) stoupá s věkem a je výrazně vyšší u diabetiků [14]. Zároveň autofluorescence úzce koreluje s celkovým množstvím všech stanovovaných AGEs v čočce [15]. Na našem pracovišti jsme v minulých letech vyšetřili u mnoha diabetiků 1. i 2. typu kožní autofluorescenci (SAF) [16], ale jednoduché měření autofluorescence oční čočky bylo dlouho nedostupné. Teprve nedávno byl vyvinut přístroj neinvazivně stanovující LAF.

Cílem této pilotní studie bylo porovnat oční a kožní autofluorescenci u diabetiků 1. a 2. typu a výsledky srovnat se zdravými kontrolami.

Soubor vyšetřených a metody

Měření autofluorescence oční čočky (LAF) a kůže (SAF) u diabetiků i zdravých kontrol probíhalo na III. interní klinice 1. LF UK a VFN Praha na podzim roku 2014. Celkem bylo vyšetřeno 69 diabetiků (32 s diabetem 1. typu – DM1T, 37 s diabetem 2. typu – DM2T; průměrný věk 53 ± 12 let) a 49 zdravých kontrol (průměrný věk 43 ± 12 let). Podrobnější charakteristiku souboru uvádí tab. Studie

Tab. Charakteristika souboru a základní výsledky

	DM1T n = 32	DM2T n = 37	kontroly n = 49	P ANOVA
věk (roky)	44 ± 14	62 ± 10	43 ± 12	< 0,0001
hmotnost (kg)	77 ± 14	95 ± 18	79 ± 19	< 0,001
výška (cm)	175 ± 8	176 ± 9	174 ± 11	ns
BMI (kg/m ²)	25 ± 3	31 ± 5	26 ± 6	< 0,0001
HbA _{1c} (mmol/mol)	69 ± 14	60 ± 20	33 ± 4	< 0,0001
HbA _{1c} prům. (mmol/mol)	70 ± 15	60 ± 18	33 ± 5	< 0,0001
glykemie nalačno (mmol/l)	7,6 ± 3,4	7,7 ± 2,8	4,5 ± 0,7	< 0,0001
LAF	0,27 ± 0,09	0,22 ± 0,06	0,17 ± 0,04	< 0,0001
SAF (AU)	2,0 ± 0,4	2,3 ± 0,6	1,8 ± 0,3	< 0,0001
ACR (g/mol)	0,9 (0,0-18,2)	3,6 (0,2-80,4)	–	–

byla v souladu s Helsinskou deklarací a byla schválena Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice Praha.

K měření LAF byl poprvé v České republice využit biomikroskop ClearPath DS-120 (Freedom Meditech, San Diego, US), který neinvazivně stanovuje autofluorescenci levé oční čočky. Během několika vteřin přístroj osvětí čočku modrým světlem a měří fluorescenční zelené světlo a zároveň rozptýlené modré světlo. Softwarově je pak vypočten poměr autofluorescence čočky k rozptýlenému světlu v centrální části oční čočky, který nás informuje o množství akumulovaných konečných produktů glykace AGEs. Čím vyšší tento poměr je, tím je obsah AGEs v čočce vyšší [17]. Přináší tak novou informaci o dlouhodobé glykační zátěži konkrétního jedince. Kožní autofluorescence (SAF) byla měřena na předloktí pomocí AGE-Readeru (DiagnOptics BV, Groningen, Nizozemí) dle originálních doporučení [18] a je uváděna v arbitrárních jednotkách (AU).

Výsledky LAF a SAF vyšetřených osob byly srovnány s jejich věkem, antropometrickými údaji, glykovaným hemoglobinem (HbA_{1c}) a albuminurií, vyjádřenou pomocí poměru močového albuminu/kreatininu (ACR). Za pozitivní mikroalbuminurii byl považován $ACR > 3$ g/mol. Vzhledem k logaritmickému rozložení ACR byla data logaritmována. Stav kompenzace diabetu byl vyjádřen jednak glykovaným hemoglobinem v době měření (HbA_{1c}), a dále průměrnou hodnotou glykovaného hemoglobinu v posledním roce (HbA_{1c} prům).

Výsledky biochemických parametrů jsou vyjádřeny jako průměr a směrodatná odchylka (SD), popř. průměr

a rozpětí u logaritmických dat. Rozdíly mezi skupinami byly vyhodnoceny jednocestnou variační analýzou (ANOVA) s post hoc testy. Korelace byly stanoveny pomocí Pearsonova koeficientu. Statistická analýza byla provedena v programu Statistica 12 (StatSoft).

Výsledky

Autofluorescence oční čočky (LAF) byla významně vyšší u pacientů s diabetem 1. i 2. typu oproti kontrolám ($0,27 \pm 0,09$; $0,22 \pm 0,06$; $0,17 \pm 0,04$; $p < 0,0001$). Analogické výsledky byly pozorovány u SAF ($2,0 \pm 0,4$; $2,3 \pm 0,6$; $1,8 \pm 0,3$ AU; $p < 0,0001$). V jednotlivých případech jsme identifikovali několik osob bez diabetu se zvýšenou autofluorescencí čočky. Naproti tomu se vyskytlo několik případů recentně zachycených diabetiků 1. typu, u kterých byla autofluorescence nízká. Glykovaný hemoglobin v době měření byl vyšší u DM1T oproti DM2T a kontrolám (69 ± 14 ; 60 ± 20 ; 33 ± 3 mmol/mol; $p < 0,0001$) a velice srovnatelné výsledky byly i u průměrného HbA_{1c} v posledním roce.

Ve všech skupinách byla pozorována závislost autofluorescence na věku (LAF: $r = 0,31$, $p < 0,001$; SAF: $r = 0,61$, $p < 0,0001$). Naopak souvislost s HbA_{1c} se projevila jen u DM2T jak v případě LAF (DM1T: $r = 0,10$, ns; DM2T: $r = 0,46$, $p < 0,01$; kontroly: $r = 0,28$, ns, obr. 1, tak v případě SAF (DM1T: $r = 0,32$, ns; DM2T: $r = 0,62$, $p < 0,0001$; kontroly: $r = 0,22$, ns). Podobné byly závislosti i s průměrným HbA_{1c} v posledním roce. Ve všech skupinách byl pozorován významný vztah mezi LAF



Fluorescence AGEs v oční čočce

– neinvazivní metoda screeningu diabetu s přístrojem ClearPath



RYCHLE

BEZBOLESTNĚ

VČAS

Onemocnění odhalí až 7 let před vznikem komplikací.

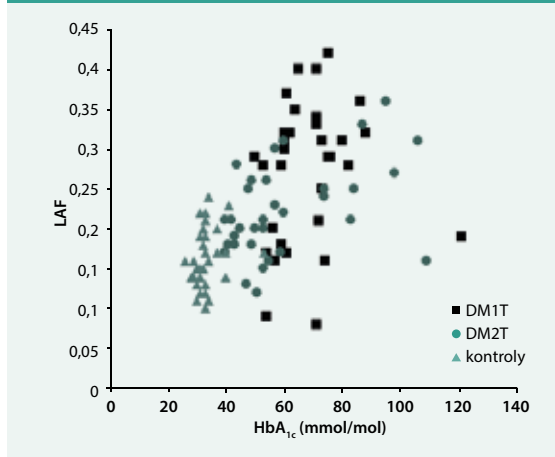
Rychlé měření s okamžitými výsledky.

Více o metodě měření fluorescence naleznete na:
www.diariziko.cz Certifikace CE i FDA.



Videris s. r. o.
 Shiran Tower
 Lužná 716/2
 160 00 Praha 6

T: +420 226 220 866
F: +420 226 220 867
E: info@videris.cz
www.videris.cz
www.diariziko.cz

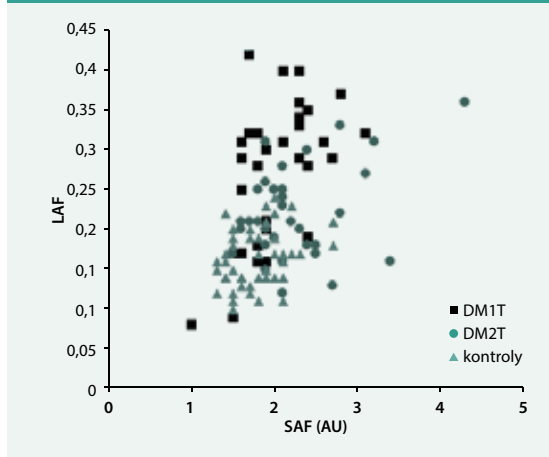
Obr. 1. Závislost autofluorescence oční čočky (LAF) na HbA_{1c}

a SAF (DM1T: $r = 0,53$, $p < 0,005$, DM2T: $r = 0,37$, $p < 0,05$; kontroly: $r = 0,30$, $p < 0,05$) (obr. 2). LAF se významně nelišila u pacientů bez či s pozitivní (mikro)albuminurií.

Diskuse

Autofluorescence oční čočky stanovená biomikroskopem ClearPath DS-120 přináší snadno dostupný parametr reflektující dlouhodobou zátěž organismu glykačními mechanizmy. Tím hlavním faktorem zvyšujícím LAF je nepochybně chronická porucha glukózového metabolismu s opakovanou hyperglykemií. Lze tedy předpokládat, že se takové déletrvající latentní onemocnění odrazí v celkové LAF a upozorní na možné riziko diabetu dříve, než dojde ke klinickým projevům hyperglykemie. Na druhou stranu je ale nutné zdůraznit, že rychle rozvinutý diabetes v mladším věku se nemusí vyšší LAF ještě projevit. Definitivní diagnóza diabetu je tak stále založena pouze na laboratorně stanovené hyperglykemii nalačno, během orálního glukózového tolerančního testu či náhodné hyperglykémii s klinickými příznaky.

V naší pilotní studii byla závislost LAF na aktuální hladině HbA_{1c} i průměrném HbA_{1c} v posledním roce jen částečná. Je pravděpodobné, že aktuální i průměrný glykovaný hemoglobin v posledním roce dostatečně neodrážejí mnohaletý stav glykace v organismu, a tudíž s autofluorescencí čočky souvisí jen parciálně. Navíc naměřená LAF podává informaci o množství fluorescenčních molekul, zatímco některé AGEs fluorescenční vlastnosti nemají, a tudíž o jejich hromadění přesnou představu nemáme. V minulosti však bylo prokázáno, že mezi fluorescenčními a nefluorescenčními molekulami je silná pozitivní závislost [19]. V naší relativně malé studii jsme nepozorovali významnější rozdíly v LAF u pacientů bez či s pozitivní albuminurií. Je však možné, že v patogenezi diabetické nefropatie se uplatňují i nefluorescenční AGEs či další mechanismy.

Obr. 2. Závislost autofluorescence oční čočky (LAF) na kožní autofluorescenci (SAF)

Námi prezentovaná významná závislost mezi autofluorescencí čočky a kůže u pacientů s diabetem 2. typu doposud nebyla publikována, zatímco u pacientů s diabetem 1. typu již byl podobný vztah doložen [20]. Obě práce dokládají, že glykační proces srovnatelně postihuje různé tkáně organismu.

Je jistě lákavá představa, že se oční autofluorescence stane robustním ukazatelem dlouhodobé kompenzace diabetu predikujícím riziko dalších komplikací, avšak na definitivní potvrzení takové hypotézy si budeme muset ještě počkat.

Literatura

- Maillard LC. The action of amino acids on sugar; the formation of melanoidin by a methodic route. *Cr Hebd Acad Sci* 1912; 154: 66–68.
- Ortwerth BJ, Chemoganskiy V, Mossine VV et al. The effect of UVA light on the anaerobic oxidation of ascorbic acid and the glycation of lens proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(7): 3094–3102.
- Schalkwijk CG, Miyata T. Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics. *Amino acids* 2012; 42(4): 1193–1204.
- Boyd AC, Abdel-Wahab YHA, McKillop AM et al. Impaired ability of glycated insulin to regulate plasma glucose and stimulate glucose transport and metabolism in mouse abdominal muscle. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1523(1): 128–134.
- Gugliucci A. “Blinding” of AMP-dependent kinase by methylglyoxal: A mechanism that allows perpetuation of hepatic insulin resistance? *Medical Hypotheses* 2009; 73(6): 921–924.
- Shui YB, Beebe DC. Age-dependent control of lens growth by hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(3): 1023–1029.
- Tomana M, Prchal JT, Garner LC et al. Gas-chromatographic analysis of lens monosaccharides. *J Lab Clin Med* 1984; 103(1): 137–142.
- Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. Identification of N-epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* 1986; 261(11): 4889–4894.
- Sell DR, Monnier VM. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular-matrix – implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem* 1989; 264(36): 21597–21602.
- Nagaraj RH, Linetsky M, Stitt AW. The pathogenic role of Maillard reaction in the aging eye. *Amino acids* 2012; 42(4): 1205–1220.

11. Monnier VM, Sun WJ, Sell DR et al. Glucosepane: a poorly understood advanced glycation end product of growing importance for diabetes and its complications. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52(1): 21–32.
12. Vannas MWA. Eine Methode zur Messung der Fluoreszenz (for lehnenden menschlichen Augenlinse und eine Untersuchung über ihre Abhängigkeit). *Alter Klin Monatabl Augenh* 1938; 95: 53–64.
13. Klang G. Measurements and studies of the fluorescence of the human lens in vivo. *Acta ophthalmologica* 1948; 31: 1–152.
14. Bleeker JC, Vanbest JA, Vrij L et al. Autofluorescence of the lens in diabetic and healthy-subjects by fluorophotometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27(5): 791–794.
15. Abiko T, Abiko A, Ishiko S et al. Relationship between autofluorescence and advanced glycation end products in diabetic lenses. *Exp Eye Res* 1999; 68(3): 361–366.
16. Škrha J, Soupal J, Ekali GL et al. Skin Autofluorescence Relates to Soluble Receptor for Advanced Glycation End-Products and Albuminuria in Diabetes Mellitus. *J Diab Res* 2013, 2013: 650694. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/650694>>.
17. Burd J, Lum S, Cahn F et al. Simultaneous noninvasive clinical measurement of lens autofluorescence and rayleigh scattering using a fluorescence biomicroscope. *J Diabetes Sci Technol* 2012; 6(6): 1251–1259.
18. Mulder DJ, Water TV, Lutgers HL et al. Skin autofluorescence, a novel marker for glycemic and oxidative stress-derived advanced glycation endproducts: an overview of current clinical studies, evidence, and limitations. *Diabetes Technol Ther* 2006; 8(5): 523–535.
19. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PHN et al. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia* 2004; 47(7): 1324–1330.
20. Januszewski AS, Sachithanandan N, Karschimkus C et al. Non-invasive measures of tissue autofluorescence are increased in Type 1 diabetes complications and correlate with a non-invasive measure of vascular dysfunction. *Diabet Med* 2012; 29(6): 726–733.

MUDr. Jan Škrha jr

✉ jan.skrha@seznam.cz

III. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha

www.int3.lf1.cuni.cz

Doručeno do redakce 15. 2. 2015

Přijato po recenzi 13. 3. 2015