

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Katedra i Klinika Chorób Metabolicznych

Natalia Nowak

***Ocena 1,5-anhydroglucitolu jako markera
wyrównania metabolicznego u ciężarnych z
cukrzycą typu 1***

Rozprawa doktorska

Promotor: Prof. dr hab. med. Maciej T. Małecki

Pracę wykonano w Katedrze Chorób Metabolicznych Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Kierownik Katedry: Prof. dr hab. Maciej T. Małecki

Kraków 2012

Składam serdeczne podziękowania,

*Panu Profesorowi Maciejowi Małeckiemu, mojemu promotorowi,
za życzliwość, inspirację i motywowanie do badań
oraz cenne sugestie w toku realizacji pracy
doktorskiej*

*Pani Doktor Katarzynie Cyganek za pomoc w zbieraniu materiału pacjentek z
cukrzycą typu 1*

Środki finansowe na przeprowadzenie badań pochodziły z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego numer N N407 414436.

Wykaz skrótów

1,5-AG - 1,5-anhydroglucitol

ABTS - kwas 2,2'-azyno-di (3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)

ACR - współczynnik albumina/kreatynina (ang. *albumin/creatinine ratio*)

ADP - adozynodwufosforan (ang. *adenosine 5'-diphosphate*)

ADA - Amerykańskie Towarzystwo Diabetologiczne (ang. *American Diabetes Association*)

APCI - jonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym (ang. *Atmospheric-pressure chemical ionization*)

ATP - adozynotrójfosforan (ang. *adenosine triphosphate*)

CGMS - system ciągłego monitorowania glikemii (ang. *continuous glucose monitoring system*)

CV - współczynnik zmienności (ang. *coefficient of variation*)

CSII - metoda ciągłego podskórnego wlewu insuliny (ang. *Continuous Subcutaneous Insulin Infusion*)

DCCT - (ang. *Diabetes Control and Complications Trial Study*)

GC-MS - chromatografia gazowa w sprzężeniu ze spektrometrem mas (ang. *gas chromatography–mass spectrometry*)

GDM - cukrzyca ciążowa (ang. *Gestational Diabetes Mellitus*)

EDTA - kwas etylenodiaminoczwerooctowy (ang. *ethylenediaminetetracetic acid*)

EI - jonizacja w strumieniu elektronów (ang. *electron ionisation*)

ELISA - enzymatyczny test immunosorpcyjny (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ESI – jonizacja w elektrospreju (ang. *electrosprey ionisation*)

GK - glukokinaza (ang. *glucokinase*)

G3DH - dehydrogenaza glukozy (ang. *glucose-3-dehydrogenase*)

HAPO - (ang. *Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes Study*)

HbA_{1c} - hemoglobina glikowana

HILIC – technika oddziaływań hydrofilowych (ang. *Hydrophilic interaction chromatography*)

HPLC - wysokorozdzielcza chromatografia cieczowa (ang. *high performance liquid chromatography*)

FA - fruktozamina

FDA - Administracja Do Spraw Leków i Żywnienia (ang. *Food and Drug Administration*)

FID - detektor płomieniowo-jonizacyjny (ang. *flame ionisation detector*)
HNF - hepatocytowy czynnik jądrowy (ang. *hepatocyte nuclear factor*)
IGT - upośledzona tolerancja glukozy (ang. *impaired glucose tolerance*)
IL-6 - interleukina 6
LGA - wyższa od należnej masa urodzeniowa (ang. *Large for Gestational Age*)
LPS - lipopolisacharyd
MBG - średnie stężenie glukozy we krwi (ang. *Mean Blood Glycemia*)
MMBG - średnie maksymalna glikemia (ang. *Mean Maximal Blood Glucose*)
MCP-1 - białko stymulujące monocyty (ang. *Monocyte chemoattractant protein*)
NF-KB - transkrypcyjny czynnik jądrowy KB (ang. *nuclear factor*)
NCG - N-karbamoilo-β-D-glukopiranozyloamina (ang. *N-carbamoyl-B-Dglucopyranosylamine*)
MODY - cukrzyca młodzieży okresu dojrzewania (ang. *maturity-onset diabetes of the young*)
PEP - fosfo-enolopirogronian (ang. *phosphoenolopyruvate*)
PGDM - cukrzyca przedciążowa (ang. *pre-gestational diabetes mellitus*)
PPHG – hiperglikemia poposiłkowa (ang. *postprandial hyperglycemia*)
PK - kinaza pirogronianowa (ang. *pyruvate kinase*)
PROD - oksydaza pyranozy (ang. *pyranose oxidase*)
SD - odchylenie standartowe (ang. *standard deviation*)
SGLT4 - sodozależny transporter dla glukozy (ang. *Sodium dependent glucose transporter*)
SMBG - samodzielne monitorowanie glikemii (ang. *Self Blood Monitoring*)
SPE - ekstrakcja do fazy stałej (ang. *Solid Phase Extraction*)
SRM - monitorowanie wybranych reakcji fragmentacji (ang. *Selective Reaction Monitoring*)
T1DM - cukrzyca typu 1 (ang. *type 1 diabetes mellitus*)
T2DM - cukrzyca typu 2 (ang. *type 2 diabetes mellitus*)
TNB - tetrabenzydina (ang. *tetrabenzidine*)
TNF1α - czynnik wzrostu nowotworów (ang. *tumor necrosis factor*)

Spis tabel

Tabela 1. Klasyfikacja cukrzycy u kobiet w ciąży według White.

Tabela 2. Docelowe wartości glikemii i HbA_{1c} u kobiet w ciąży (PGDM i GDM) - samokontrola za pomocą glukometrów

Tabela 3. Stężenie 1,5-AG w populacji ogólnej

Tabela 4. Warunki rozdziału chromatograficznego stosowane dla 1,5-AG i innych monocukrów oraz polioli

Tabela 5. Charakterystyka kliniczna ciężarnych z T1DM oraz grupy kontrolnej

Tabela 6. Wartości wskaźników glikemii u ciężarnych z T1DM w poszczególnych trymestrach ciąży

Tabela 7. Korelacja pomiędzy poziomem 1,5-AG oraz HbA_{1c} a parametrami SMBG

Tabela 8. Korelacja pomiędzy 1,5-AG, HbA_{1c} oraz indeksami glikemii w zapisie CGMS

Tabela 9. Wyniki regresji wieloczynnikowej dla AUC-140 na podstawie CGMS

Tabela 10. Charakterystyka pacjentek z T1DM w zależności od masy urodzeniowej dziecka

Tabela 11. Korelacja poszczególnych wskaźników glikemii z masą urodzeniową płodu

Tabela 12. Wyniki regresji liniowej zmiennej zależnej masa urodzeniowa dziecka

Tabela 13. Wyniki regresji liniowej zmiennej zależnej masa urodzeniowa dziecka

Tabela 14. Wyniki jednoczynnikowej regresji logistycznej dla LGA oraz makrosomii

Tabela 15. AUC oraz ilorazy szans wystąpienia LGA skorygowane względem BMI i wieku dla 1,5-AG, HbA_{1c} oraz wybranych parametrów glikemii w SMBG

Tabela 16. AUC oraz ilorazy szans wystąpienia makrosomii skorygowane względem BMI i wieku dla 1,5-AG, HbA_{1c} oraz wybranych parametrów glikemii w SMBG

Spis rycin

Rycina 1. Etapy reakcji enzymatycznych wykorzystywanych w rutynowych metodach oznaczenia 1,5-AG w surowicy

Rycina 2. Etapy reakcji enzymatycznych wykorzystywanych w zmodyfikowanej metodzie oznaczenia 1,5-AG i glukozy w surowicy.

Rycina 3. Przykładowy zapis CGMS

Rycina 4. Średnie stężenie 1,5-AG w poszczególnych trymestrach ciąży u kobiet z T1DM

Rycina 5. Korelacja pomiędzy stężeniem 1,5-AG a polem nad krzywą glikemii 140 mg/dl uzyskanego na podstawie zapisu CGMS

Rycina 6. Korelacja pomiędzy stężeniem 1,5-AG a średnią glikemią na podstawie zapisu CGMS

Rycina 7. Korelacja pomiędzy stężeniem 1,5-AG a średnim maksymalnym stężeniem glukozy na podstawie zapisu CGMS

Rycina 8. Stężenie 1,5-AG w podgrupach ciężarnych z T1DM zdefiniowanych na podstawie kryterium hiperglikemii 140 mg/dl dla punktu odcięcia równego 4,79 $\mu\text{g/ml}$

Rycina 9. Stężenie 1,5-AG w podgrupach ciężarnych z T1DM zdefiniowanych na podstawie kryterium glikemii 120 mg/dl dla punktu odcięcia 4,89 $\mu\text{g/ml}$

Rycina 10. Porównanie krzywych ROC dla 1,5-AG oraz HbA_{1c} jako markerów hiperglikemii a) powyżej 140 mg/dl; b) powyżej 120 mg/dl

Rycina 11. Stężenie 1,5-AG w podgrupach ciężarnych z T1DM zdefiniowanych na podstawie kryterium hiperglikemii 140 mg/dl

Rycina 12. Krzywa ROC dla 1,5-AG jako markera PPHG powyżej 140 mg/dl w CGMS

Rycina 13. Porównanie krzywych ROC 1,5-AG i HbA_{1c} jako markerów hiperglikemii powyżej 140 mg/dl uzyskanej w CGMS

Rycina 14. Średnie stężenie 1,5-AG u ciężarnych w a) II oraz b) III trymestrze ciąży w grupach z LGA oraz prawidłową masą położniczą

Rycina 15. Korelacja pomiędzy stężeniem 1,5-AG u matki w III trymestrze ciąży a masą położniczą noworodka

Rycina 16. Wyniki analizy ROC dla 1,5-AG jako markera LGA: a) relacja pomiędzy czułością i swoistością 1,5-AG; b) Krzywa ROC

Rycina 17. Wyniki analizy ROC dla 1,5-AG jako markera makrosomii: a) relacja pomiędzy czułością i swoistością 1,5-AG; b) Krzywa ROC

SPIS TREŚCI:

1. Wstęp	9
1.1. Cięża powikłana cukrzycą.....	9
1.1.1. Definicja i klasyfikacja cukrzycy w ciąży.....	9
1.1.2. Cukrzyca typu 1 w ciąży.....	11
1.1.3. Związek hiperglikemii z przebiegiem ciąży.....	12
1.2. Monitorowanie wyrównania metabolicznego w ciąży.....	15
1.3. 1,5-anhydroglucitol jako marker kontroli glikemii.....	17
1.3.1. Charakterystyka biochemiczna 1,5-AG.....	17
1.3.2. Znaczenie 1,5-AG jako markera wyrównania metabolicznego w cukrzycy.....	20
1.3.3. Metodologia oznaczeń 1,5-AG.....	21
1.3.3.1. Metody enzymatyczne.....	22
1.3.3.2. Metody chromatograficzne.....	27
1.4. Potencjalne znaczenie kliniczne oznaczeń 1,5-AG w ciąży.....	34
2. Cele pracy	37
3. Metodyka	38
3.1. Badana grupa.....	38
3.2. Ocena wyrównania metabolicznego.....	41
3.2.1. Metodyka oznaczeń stężenia 1,5-AG.....	41
3.2.2. Metodyka oznaczeń HbA _{1c}	42
3.2.3. Pomiar dobowych profili glikemii.....	42
3.3. Ocena danych położniczych u ciężarnych z T1DM.....	44
3.4. Analiza statystyczna.....	45
4. Wyniki badań	46
4.1. Poziom 1,5-AG w badanych grupach kobiet.....	46
4.2. Analiza korelacji 1,5-AG oraz HbA _{1c} ze wskaźnikami uzyskanymi na podstawie SMBG i CGMS.....	49
4.2.1. Ocena zależności pomiędzy 1,5-AG i HbA _{1c} oraz parametrami SMBG.....	49
4.2.2. Ocena zależności pomiędzy 1,5-AG i HbA _{1c} oraz parametrami CGMS.....	51
4.2.3. Analiza wieloczynnikowa związku 1,5-AG, HbA _{1c} oraz glikemii	

w SMBG z AUC-140.....	55
4.3. Ocena 1,5-AG jako markera hiperglikemii poposiłkowej.....	56
4.3.1. Ocena 1,5-AG jako markera PPHG w SMBG.....	56
4.3.2. Porównanie wartości klinicznej 1,5-AG i HbA _{1c} jako markerów PPHG w SMBG.....	58
4.3.3. Ocena 1,5-AG jako markera PPHG uzyskanej na podstawie pomiaru CGMS.....	60
4.4. Ocena zależności pomiędzy stężeniem 1,5-AG u matki a masą urodzeniową noworodka.....	62
4.4.1. Charakterystyka kliniczna badanej grupy.....	62
4.4.2. Analiza korelacji pomiędzy 1,5-AG oraz innymi wskaźnikami wyrównania metabolicznego a masą urodzeniową noworodka.....	64
4.4.3. Analiza związku stężenia 1,5-AG z masą urodzeniową noworodka.....	66
4.5. Ocena 1,5-AG jako predyktora noworodkowej LGA i makrosomii.....	68
4.5.1. Wyniki jednoczynnikowej regresji logistycznej.....	68
4.5.2. Wyniki wieloczynnikowej regresji logistycznej.....	70
4.5.3. Analiza użyteczności klinicznej 1,5-AG jako predyktora makrosomii i LGA metodą ROC.....	73
5. Dyskusja.....	76
6. Wnioski.....	90
7. Piśmiennictwo.....	91
8. Streszczenie w języku polskim.....	103
9. Streszczenie w języku angielskim.....	106

1. WSTĘP

Podstawą najnowszych strategii terapeutycznych u kobiety ciężarnej z cukrzycą typu 1 (T1DM) jest dążenie do uzyskania stężeń glukozy zbliżonych maksymalnie do poziomów obserwowanych u kobiet w ciąży fizjologicznej [1]. Aby warunek ten został spełniony, niezbędna jest dostępność precyzyjnych narzędzi monitorujących wyrównanie metaboliczne w tej grupie pacjentek. Aktualnie nie dysponujemy żadnym idealnym markerem kontroli glikemii, przez co szybka i precyzyjna identyfikacja jej zmian nie jest możliwa [2]. Nowym, obiecującym markerem, który mógłby znaleźć potencjalne zastosowanie w monitorowaniu glikemii w ciąży powikłanej T1DM jest 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG), krótkoterminowy wskaźnik wyrównania metabolicznego. Do chwili obecnej użyteczność 1,5-AG jako markera kontroli glikemii w ciąży powikłanej T1DM nie została zweryfikowana.

1.1. Ciąża powikłana cukrzycą

1.1.1. Definicja i klasyfikacja cukrzycy w ciąży

Cukrzyca stanowi najczęstsze powikłanie metaboliczne występujące w ciąży. Choroba ta może występować u kobiety przed ciążą w postaci T1DM lub cukrzycy typu 2 (T2DM); mówimy wtedy o cukrzycy przedciążowej (PGDM, *pre-gestational diabetes mellitus*). Częściej jednak to powikłanie metaboliczne ujawnia się w ciąży jako cukrzyca ciążowa (GDM, *gestational diabetes mellitus*) [3].

GDM jest związana z narastającą w ciąży insulinoopornością. Wynika ona z przyrostu tkanki tłuszczowej oraz zwiększenia poziomów hormonów: wydzielanego przez łożysko laktogenu łożyskowego oraz estrogenów, progesteronu i kortyzolu. GDM charakteryzuje się najczęściej stosunkowo niewielkim wzrostem stężenia glukozy we krwi, głównie po posiłkach. Zalecenia dietetyczne jest u większości kobiet z GDM postępowaniem wystarczającym, u pozostałych dla uzyskania normoglikemii konieczna jest insulinoterapia. T1DM występuje rzadziej, bo w około 10% przypadków cukrzycy wikłającej ciążę, jednakże ze względu na

cięższy przebieg kliniczny związany z wyższymi wartościami oraz zmiennością glikemii jest bardzo trudnym problemem klinicznym. Całkowity niedobór insuliny, dominujący w patogenezie tego typu cukrzycy, powoduje, że konieczne jest leczenie insuliną [3-4].

Powszechnie stosowanym podziałem cukrzycy w ciąży jest jej klasyfikacja według P. White, uwzględniająca czynnik czasowy trwania cukrzycy oraz występowanie powikłań naczyniowych. Klasyfikacja ta wyróżnia 10 klas choroby [Tabela 1].

Tabela 1. Klasyfikacja cukrzycy u kobiet w ciąży według White.

Klasa cukrzycy	Definicja
GDM	Różnego stopnia zaburzenia tolerancji węglowodanów, które po raz pierwszy zostały rozpoznane lub wystąpiły w ciąży
A	Łagodna nietolerancja glukozy rozpoznawana w ciąży
B	Cukrzyca rozpoznana po 20 rż, wywiad krótszy niż 10 lat, bez zmian w obrębie naczyń
C	Cukrzyca rozpoznana między 10 a 19 rż, trwająca 10-19 lat, bez zmian naczyniowych
D	Cukrzyca rozpoznana przed 10 rż, trwająca dłużej niż lub zwapnienia kończyn dolnych nadciśnienie bądź retinopatia
E	Zwapnienie tętnic w obrębie miednicy
F	Nefropatia cukrzycowa
R	Retinopatia proliferacyjna
H	Choroba niedokrwienna serca, kardiomiopatia
T	Stan po transplantacji nerki

Według: Sieradzki J. Cukrzyca. Kompendium. Via Medica 2009.

1.1.2. Cukrzyca typu 1 w ciąży

Ciąża powikłana T1DM cechuje się wysokim ryzykiem zarówno dla matki jak i dziecka. Ryzyko związane jest z wpływem hiperglikemii na rozwój płodu, przebieg ciąży oraz progresję powikłań cukrzycy u kobiety z T1DM [5].

Wpływ cukrzycy na stan płodu zależy od okresu ciąży oraz wartości glikemii. Obecność niewyrównanej cukrzycy w okresie przedkoncepcyjnym i wczesnej ciąży zwiększa ryzyko poronień [5, 6]. Hiperglikemia w czasie organogenezy, czyli w I trymestrze ciąży, jest związana ze wzrostem ryzyka wystąpienia u dziecka wad wrodzonych cewy nerwowej, serca, układu kostnego i innych [5,7]. Wysokie wartości glikemii w kolejnych trymestrach także stwarzają zagrożenie dla rozwijającej się ciąży. Odnosi się to na przykład do zakażeń wewnątrzmacicznych, przedwczesnego porodu oraz powikłań okresu okołoporodowego. Hiperglikemia u ciężarnej może być także przyczyną przedwczesnych porodów oraz obumarcia wewnątrzmacicznego [8]. Częste powikłania noworodkowe to makrosomia, hipoglikemia okresu okołoporodowego, policytomia, hipokalcemia, hiperbilirubinemia i zespół niewydolności oddechowej [9-12]. Najczęstszym z tych powikłań jest makrosomia lub wyższa od należytą masę urodzeniową noworodka (LGA, *Large for Gestational Age*, masa urodzeniowa \geq 90 centyla). Nadmierny wzrost masy ciała płodu, a zwłaszcza tkanki tłuszczowej, zależy w dużym stopniu od stężenia glukozy u matki w III trymestrze ciąży. U kobiet z niewyrównaną T1DM wykazano zwiększony poziom transportera dla glukozy GLUT1 w łożysku [13]. Wyższe stężenie glukozy we krwi matki jest przyczyną hiperglikemii i hiperinsulinemii u płodu, co przekłada się na zwiększone odkładanie tłuszczów w różnych tkankach (na przykład w mięśniach, wątrobie) i wzrost samej tkanki tłuszczowej.

U kobiet w ciąży powikłanej T1DM wzrasta ryzyko kwasicy ketonowej, zakażeń wewnątrzmacicznych oraz progresji istniejących powikłań cukrzycy. Jak wykazały duże badania kliniczne - DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial Study*) oraz EURODIAB - wysoki poziom hemoglobiny glikowanej (HbA_{1c}) i czas trwania cukrzycy stanowią u ciężarnych z T1DM czynniki ryzyka progresji do retinopatii proliferacyjnej oraz wystąpienia mikroalbuminurii [14, 15].

Opieka diabetologiczna w okresie przed ciążą oraz poprawa wyrównania metabolicznego w ciąży zmniejszyły umieralność okołoporodową matek chorych na T1DM, która jest obecnie prawie taka sama jak w populacji ogólnej, oraz spowodowały, że ciąża nie skraca ich oczekiwanego czasu przeżycia. Nawet po niemal całkowitej normalizacji glikemii ryzyko wady wrodzonej u płodów matek chorujących na cukrzycę jest większe niż u matek bez cukrzycy. Rozpoznaje się je u około 6,5-13% płodów matek z PGDM [16-18]. Częstość występowania zgonów okołoporodowych w ciąży powikłanej PGDM jest oceniana na 2-9%. Do najczęstszych powikłań ciąży z T1DM zalicza się makrosomię płodu. Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że stwierdza się ją u 20-60% noworodków matek z T1DM [17, 19, 20, 21]. Główną przyczyną tego stanu rzeczy jest w dalszym ciągu odbiegające od idealnego wyrównanie glikemii u wielu kobiet z T1DM.

1.1.3. Związek hiperglikemii z przebiegiem ciąży

Badania dotyczące wpływu hiperglikemii matki na stan płodu uświadomiły naukowcom i klinicytom pracującym na polu diabetologii ogromną wagę ścisłego wyrównania metabolicznego u ciężarnej z T1DM.

Zaobserwowano istotny związek pomiędzy podwyższonym stężeniem HbA_{1c} w surowicy ciężarnych z T1DM w I trymestrze ciąży a występowaniem wad wrodzonych u płodu; z kolei normoglikemia u kobiety ciężarnej w okresie przedkoncepcyjnym i w I trymestrze ciąży pozwala zapobiegać ich rozwojowi [22].

W licznych badaniach opisano ciągłą, liniową zależność pomiędzy glikemią matki a wielkością płodu. Uważa się, że ryzyko makrosomii i LGA znamienne wzrasta już przy średnim stężeniu glukozy w profilu dobowym matki powyżej 100 mg/dl (5,5 mmol/l), natomiast przy średnim dobowym stężeniu glukozy powyżej 130 mg/dl (7,2 mmol/l) zagrożenie rośnie ponad dwukrotnie [23, 24, 25]. Z kolei makrosomia lub LGA są przyczyną

większej częstości cięć cesarskich, dystocji barkowej oraz urazów okołoporodowych noworodka lub kanału rodniego kobiety. Istnieją także nowe dowody, że LGA występująca pomiędzy 20 a 40 tygodniem ciąży istotnie zwiększa ryzyko obumarć wewnątrzmacicznych płodów [26].

W ocenie skuteczności wyrównania metabolicznego przez długie lata kierowano się przede wszystkim glukometrycznym pomiarem stężenia glukozy na czczo i przed posiłkami oraz poziomem HbA_{1c}. Tymczasem wyniki badań z ostatnich dwóch dekad w zakresie wyrównania metabolicznego u ciężarnej pokazały, że zjawiskiem co najmniej równie niebezpiecznym jak wysoki poziom glikemii na czczo czy jej średnia wartość, jest hiperglikemia poposiłkowa (PPHG, *Postprandial Hyperglycaemia*) [20, 21, 23-27, 33, 34]. Wzrost stężenia glukozy po posiłku powoduje przenikanie tego cukru przez barierę łożyskową, przyczyniając się do hiperglikemii u płodu. W licznych badaniach obserwacyjnych stwierdzono, że wartości glikemii po posiłku wykazują silniejszy związek niż średnia glikemia oraz stężenie glukozy na czczo z makrosomią, hipoglikemią, hipokalcemią u noworodka oraz liczbą cięć cesarskich [32-37]. W badaniach interwencyjnych natomiast dowiedziono, że zmniejszenie glikemii poposiłkowej jest skuteczną strategią obniżającą częstość powikłań ciąży zarówno w cukrzycy ciążowej [38] jak i przedciążowej T1DM [30, 31].

Warto zwrócić uwagę, że także u kobiet ciężarnych bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej glikemia poposiłkowa determinuje wielkość płodu. W badaniach Parretti i wsp. oceniających zależność pomiędzy wielkością płodu w badaniu ultrasonograficznym u 66 zdrowych, ciężarnych kobiet a glikemią w profilu dobowym w III trymestrze ciąży, obserwowano nieznaczny wzrost średniej dobowej glikemii od 28 tygodnia ($71,9 \pm 5,7$ mg/dl) do 38 tyg. ($78,3 \pm 5,4$ mg/dl) [23]. Jednak średnie poposiłkowe glikemie nie przekroczyły 105,2 mg/dl. Autorzy stwierdzili, że wartość glikemii poposiłkowej dodatnio korelowała z wielkością obwodu brzuszka płodu. Kolejnym badaniem, które dotyczyło informacji o związku pomiędzy PPHG a

rezultatem położniczym ciąży było wielośćrodkowe, randomizowane badanie HAPO (*Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes*) [35]. Stwierdzono, iż wzrost glikemii poposiłkowej o wartość jednego odchylenia standardowego (23 mg/dl) był związany ze wzrostem ryzyka LGA u płodu o 38%. PPHG u kobiety wiązała się także ze zwiększonym ryzykiem rozwoju nadciśnienia tętniczego indukowanego ciążą, rzucawki porodowej, przedwczesnego porodu, a także dystocji barkowej, hyperinsulinemii i hipoglikemii u noworodka.

Niewątpliwie najważniejszym wnioskiem płynącym z badania HAPO powinien być postulat ścisłego wyrównania glikemii u wszystkich kobiet z cukrzycą wklajającą ciążę, w tym pacjentek z T1DM. Polskie Towarzystwo Diabetologiczne (PTD) kierując się dowodami naukowymi, podobnie jak inne krajowe i międzynarodowe towarzystwa diabetologiczne, wprowadziło rygorystyczne wytyczne dotyczące kontroli glikemii w ciąży powikłanej cukrzycą. Zalecane stężenia glukozy oraz HbA_{1c} praktycznie odpowiadają wartościom obserwowanym u kobiet w fizjologicznej ciąży [4]. W Tabeli 2 przedstawiono aktualne zalecenia opublikowane w 2012 roku przez PTD.

Tabela 2. Docelowe wartości glikemii i HbA1c u kobiet w ciąży (PGDM i GDM) - samokontrola za pomocą glukometrów.

Rodzaj pomiaru	Stężenie glukozy w osoczu
Oznaczenie glikemii na czczo i przed posiłkiem	60-90 mg/dl (3,3-5,0 mmol/l)
Średnia dobowa glikemia	95 mg/dl (5,3 mmol/l)
1 godz po posiłku	<120 mg/dl (<6,7 mmol/l)
Między 2-4 godz. w nocy	>60 mg/dl (>3,3 mmol/l)
HbA1c	<6,1%

Według: Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę, 2012. Stanowisko PTD, Diabetologia Kliniczna, 2012, tom 1, supl. A.

1.2. Monitorowanie wyrównania metabolicznego w ciąży

Od właściwego wyrównania cukrzycy zależy zarówno stan dziecka jak i zdrowie matki, dlatego też utrzymanie glikemii w ciąży powikłanej cukrzycą w granicach stężeń typowych dla kobiet w fizjologicznej ciąży stanowi kluczowy cel terapeutyczny. Jednym z warunków jego osiągnięcia jest posiadanie precyzyjnych narzędzi oceniających wyrównanie metaboliczne u ciężarnej.

Monitorowanie zmian glikemii w ciąży powikłanej T1DM jest wyzwaniem sprawiającym wiele trudności. Wynika to głównie z faktu, że obecnie nie dysponujemy idealnym testem oceny kontroli glikemii u ciężarnej z T1DM. Powinien on być precyzyjny, dokładny, tani, wygodny dla pacjenta i łatwy w interpretacji. Żadne z dostępnych narzędzi monitorujących nie odzwierciedla gwałtownych wzrostów glikemii, w tym PPHG, która w świetle nowszych doniesień jest ważnym celem terapeutycznym [37, 38, 39]. Wykonywany w codziennej praktyce lekarskiej kilkupunktowy profil glikemii pozwala jedynie na ocenę stężeń glukozy w wybranych punktach czasowych w ciągu doby. Wynik oznaczeń przy użyciu glukometru

obarczony jest ponadto błędami wynikającymi ze dokładności pomiaru, obecności substancji interferujących we krwi pacjentki, czy jakości pasków testowych [40]. Z kolei stężenie HbA_{1c}, długoterminowego markera kontroli metabolicznej, odzwierciedlającego poziomy glikemii w czasie 2-3 miesięcy przed pomiarem (przy czym około 50% jej stężenia stanowi odzwierciedlenie glikemii za okres ostatnich 4 tygodni) wskazuje na wyrównanie pacjentów w stosunkowo odległym, szczególnie jak na okres ciąży, okresie. Ponadto, marker ten obrazuje średnią wartość glikemii we krwi w czasie przed badaniem, natomiast nie wykazuje krótkoterminowych wzrostów stężenia glukozy, w tym hiperglikemii poposiłkowej [39, 41, 42]. Z tego względu oznaczenie poziomu HbA_{1c} nie rozróżnia grup pacjentów uzyskujących rekomendowane stężenia tego wskaźnika z częstymi, ostrymi epizodami hiperglikemii od tych, którzy mają stałą, nieznaczną hiperglikemię. Optymalnym i skutecznym rozwiązaniem umożliwiającym dokładną kontrolę poziomów glukozy wydają się systemy ciągłego monitorowania glikemii (CGMS, *Continuous Glucose Monitoring System*) [43]. Urządzenie to jest szczególnie przydatne do pomiaru hipo- i hiperglikemii, które w wielu przypadkach są nierozpoznawane przy pomocy glukometrycznego dobowego profilu glikemii. CGMS nie jest jednak rutynowo wykorzystywany w opiece nad ciężarnymi z T1DM z uwagi na wysoki koszt elektrod, inwazyjność oraz skomplikowaną obsługę techniczną.

Brak wyrównania metabolicznego u ciężarnej z cukrzycą, zmusza do podejmowania działań terapeutycznych, które wymagają efektywnych narzędzi monitorujących. Istnieje potrzeba poszukiwania taniego i prostego do oznaczenia markera, który pozwoliłby na ocenę aktualnego wyrównania metabolicznego ciężarnej i jednocześnie efektywności podjętej interwencji terapeutycznej. Potencjalnie takimi właściwościami cechuje się 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG) [44]. Oznaczenie poziomu 1,5-AG testem enzymatycznym (GlycoMark, Tomen, USA) upowszechniło się dla celów rutynowej diagnostyki hiperglikemii w ostatniej dekadzie, w szczególności w Stanach Zjednoczonych i Japonii, po uzyskaniu akceptacji przez FDA

(*Food and Drug Administration*) jego wykorzystania dla celów krótkoterminowej oceny wyrównania metabolicznego. 1,5-AG ma wyższą wartość diagnostyczną niż HbA_{1c} w ocenie wahań stężenia glukozy, przede wszystkim PPHG, a potencjalna dostępność i niski koszt oznaczenia decydują o jego możliwej przewadze nad kosztownym, inwazyjnym i czasochłonnym CGMS.

1.3. 1,5-anhydroglucitol jako marker kontroli glikemii

1.3.1. Charakterystyka biochemiczna 1,5-AG

1,5-AG (1,5-deoksyglukoza) jest jednym z głównych polioli występującym w surowicy krwi; pod względem budowy strukturalnej podobny jest do D-glukozy. Związek ten nie posiada grupy hydroksylowej przy węglu C1 pierścienia i wydaje się być stabilny metabolicznie. Niewielka frakcja 1,5-AG jest przekształcana do 1,5-AG-6-P (6-fosforanu 1,5-glucitolu), przy czym dalsze etapy ewentualnego metabolizmu nie zostały poznane.

Głównym źródłem 1,5-AG w organizmie jest spożywany pokarm, przede wszystkim mięso i zboża. Ponadto, około 10% 1,5-AG pochodzi z procesów endogennej syntezy alkoholi z glukozy. Ostatnio opisano alternatywną ścieżkę, w której bezpośrednim źródłem 1,5-AG jest szlak metaboliczny związany z rozpadem glikogenu [45, 46].

Jak wspomniano wcześniej, 1,5-AG nie jest metabolizowany i u osób zdrowych osiąga stały poziom, który odzwierciedla równowagę między jego spożyciem i endogenną syntezą a wydalaniem z moczem. Warto podkreślić, że poziom 1,5-AG nie ulega krótkotrwałym wahaniom poposilkowym tak jak glukoza, co wynika z jego stosunkowo małego stężenia w pokarmach i dużej puli w organizmie oraz dystrybucji w obrębie wszystkich płynów ustrojowych. Wartości 1,5-AG w surowicy zdrowych osób rasy kaukaskiej bez cukrzycy mieszczą się w zakresie 6 do 34 µg/ml [47], natomiast u pacjentów z niewyrównaną cukrzycą są one kilkakrotnie niższe [48, 49]. Obniżone wartości 1,5-AG stwierdzano także w

schorzeniach metabolicznych (np. niedoczynności tarczycy), chorobach nowotworowych i przewlekłej niewydolności wątroby. Odnotowano istotny spadek 1,5-AG w surowicy przy $GFR < 30 \text{ ml/min/1,73m}^2$, co wyklucza zastosowanie tego markera u pacjentów z niewydolnością nerek w stadiach 4 i 5 przewlekłej choroby nerek [50].

Tabela 3. Stężenie 1,5-AG w populacji ogólnej.

Autorzy Badań	1,5-AG (ug/ml)			Metoda oznaczenia
	Mężczyźni	Kobiety	Ogółem	
Nowatzke et al., 2004	10,2-33,8	6-31,8	-	enzymatyczna
Yamanouchi et al., 1992	-	-	18,7 - 35,3	enzymatyczna
Yamanouchi et al., 1987	-	-	9,6 - 38,8	chromatograficzna
Shi et al., 1999	30+/- 6,5	26+/- 8,5	15,1 - 48,2	enzymatyczna
Lu et al., 2003	29,5+/-11,7	22,9+/- 10,5	26,7+/-11,33	enzymatyczna

Dane przedstawiono jako zakres wartości (min-max) lub średnia i odchylenie standardowe.

1,5-AG jest reabsorbowany w cewkach nerkowych przez sodozależny transporter glukozy 4 (*Sodium dependent glucose transporter 4*, SGLT4), wspólny również dla D-fruktozy i D-mannozy, natomiast odrębny od głównego systemu transportowego glukozy [51]. W warunkach hiperglikemii nadmiar glukozy jest reabsorbowany nie tylko przez jej własny system transportowy, ale także przez transporter dla 1,5-AG/fruktozy/mannozy, co wynika z podobieństwa strukturalnego między oboma cząsteczkami. Dochodzi więc do konkurencji między 1,5-AG a dominującą ilościowo glukozą o system transportowy. W efekcie obniżenia wydajności reabsorpcji nerkowej wynikającego z działania nadmiaru glukozy, wydalanie 1,5-AG w moczu w warunkach hiperglikemii jest zwiększone, co powoduje obniżenie jego stężenia w surowicy krwi. [52, 53]. Wyjaśnia to jego niski poziom u pacjentów ze źle kontrolowaną metabolicznie cukrzycą. Obniżone stężenie 1,5-AG w surowicy w odpowiedzi na zaistniały epizod hiperglikemii można stwierdzić już po około 24 godzinach od jego wystąpienia. Jego niska wartość w przypadku wielokrotnych następujących po sobie epizodów utrzymuje się przeciętnie do 2-4 tygodni, ulegając wzrostowi średnio o 0,3 $\mu\text{g/ml}$ na dzień [53].

Biologiczna rola 1,5-AG w organizmie ludzkim jest dopiero poznawana. Przeprowadzone dotychczas badania sugerują, że odgrywa on rolę zarówno wskaźnika jak i mediatora stanu zapalnego w cukrzycy [54, 55]. 1,5-AG hamuje ekspresję cytokin prozapalnych - TNF- 1α , IL-6, MCP-1, IL- 1β , a także aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κB . W stymulowanych przez lipopolisacharyd (LPS) makrofagach 1,5-AG hamuje aktywność NF- κB a także syntezę NO. Wykazano, że hamowanie syntezy cytokin przez 1,5-AG polega na hamowaniu niektórych kinaz, na przykład Akt i MAPKs, które są niezbędne do zapoczątkowania syntezy cytokin jak i do ich postranslacyjnej obróbki [55]. Inną opisaną funkcją 1,5-AG jest regulacja wydzielania insuliny [56].

1.3.2. Znaczenie 1,5-AG jako markera wyrównania metabolicznego w cukrzycy

Oznaczenie stężenia 1,5-AG budzi ostatnio duże zainteresowanie szczególnie ze względu na realną możliwość zastosowania klinicznego w monitorowaniu glikemii, głównie poposiłkowej, a także do celów oceny skuteczności leczenia hipoglikemizującego.

Obniżone stężenie 1,5-AG w surowicy świadczy albo o wystąpieniu pojedynczego epizodu hiperglikemii w ciągu 2 dni przed badaniem lub o wielokrotnych takich epizodach, które miały miejsce w okresie 3-4 tygodni przed oznaczeniem [53]. Wykazano, że 1,5-AG jest najbardziej czułym z aktualnie dostępnych markerów krótkotrwałych epizodów hiperglikemii (zwłaszcza hiperglikemii poposiłkowej) w grupach pacjentów z cukrzycą T2DM, T1DM i osób z nieprawidłową tolerancją glukozy [57-62]. Wartości czułości i swoistości diagnostycznej wyznaczone przez Kawaskai i wsp. [58] dla wartości odcięcia równej 7,0 µg/ml wynosiły 86% i 78%.

W licznych badaniach dowiedziono istnienia odwrotnej korelacji pomiędzy stężeniem 1,5-AG a maksymalną glikemią w profilu dobowym [58-61]. Stwierdzono, że korelacja 1,5-AG z PPHG wykazuje różną wartość w zależności od momentu, w którym dokonano pomiaru. Na przykład, w badaniu Stettler i wsp. [61] współczynnik korelacji wynosił odpowiednio: $r = -0,34$ ($p < 0,05$) dla oznaczenia po upływie 3 dni, $r = -0,38$ ($p < 0,05$) dla oznaczenia po upływie 7 dni oraz $r = -0,4$ ($p < 0,05$) w pomiarze po 2 tygodniach, po czym jego wartość następnie obniżała się w miarę upływu czasu. Przekonywujących dowodów na użyteczność kliniczną pomiarów 1,5-AG dostarczyło badanie Dungan i wsp. [62] odnoszące wartość stężeń poszczególnych markerów wyrównania metabolicznego do glikemii mierzonej przy zastosowaniu CGMS. Badanie przeprowadzono w grupie 34 pacjentów z cukrzycą (T1DM i T2DM), u których stężenie HbA_{1c} mieściło się w zakresie 6,5-8,0%. Obliczono średnią maksymalną glikemię oraz pole pod krzywą glikemii powyżej 180 mg/dl i 160 mg/dl i oceniono korelację pomiędzy wartością tych parametrów a 1,5-AG, FA i HbA_{1c}. W porównaniu do pozostałych markerów

stężenie 1,5-AG szczególnie silnie korelowało z AUC i PPHG. Zaobserwowano również, że osoby charakteryzujące się podobnymi stężeniami HbA_{1c} można zakwalifikować na podstawie poziomu 1,5-AG jako chorych z prawidłową lub podwyższoną PPHG. Na podstawie tych danych International Diabetes Federation (IDF) w swoich wytycznych założyła schemat diagnostyczny, w którym 1,5-AG odgrywa szczególną rolę w identyfikacji pacjentów z epizodami krótkotrwałej hiperglikemii i prawidłowym wynikiem HbA_{1c} [63].

Szybka zmienność stężenia 1,5-AG czyni go informatywnym narzędziem w ocenie krótkoterminowych zmian glikemii u chorych z cukrzycą. Konsekwencją tego faktu jest możliwość wykorzystania informacji na temat dynamiki zmian 1,5-AG w surowicy do oceny skuteczności leczenia wdrożonego u pacjentów. Wyjątkiem jest terapia inhibitorami alfa-glukozydaz, które hamując wchłanianie jelitowe 1,5-AG zaburzają jego poziom w surowicy [64]. Szczególnie przydatną kwestią jest monitorowanie leczenia poprzez kolejne oznaczenia 1,5-AG u tego samego pacjenta.

Należy ponownie podkreślić, że na poziom 1,5-AG w surowicy wpływa, oprócz diety i poziomu glikemii, także próg nerkowy dla glukozy [65]. Tak więc jego zastosowanie kliniczne w niektórych grupach pacjentów, u których występuje obniżony próg nerkowy dla glukozy, wymaga pogłębionych badań. Te grupy pacjentów to przede wszystkim kobiety ciężarne, pacjenci z niewydolnością nerek oraz osoby z genetycznie zmienioną funkcją cewek nerkowych. Do tych ostatnich należy monogenowa postać cukrzycy MODY (*Maturity Onset Diabetes of The Young*) związana z mutacjami czynnika transkrypcyjnego HNF1A (Hepatocytowy Czynniki Jądrowy 1 Alfa, *Hepatic Nuclear Factor 1 Alpha*) [66].

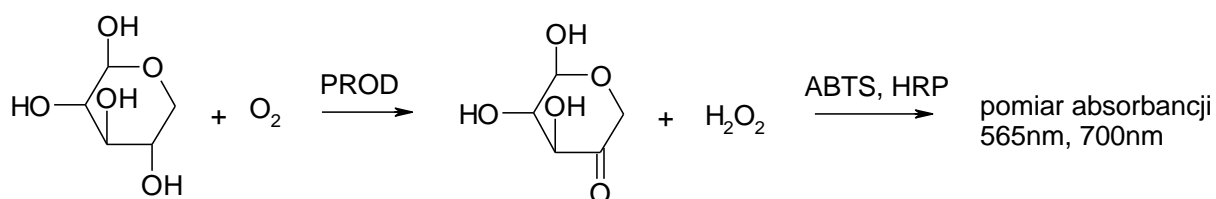
1.3.3. Metodologia oznaczeń 1,5-AG

1,5-AG występuje w surowicy u ludzi w zakresie stężeń 1-40 µg/ml. Został on zidentyfikowany najpierw w płynie mózgowo-rdzeniowym przez Pitkänen' a i wsp. [67], a

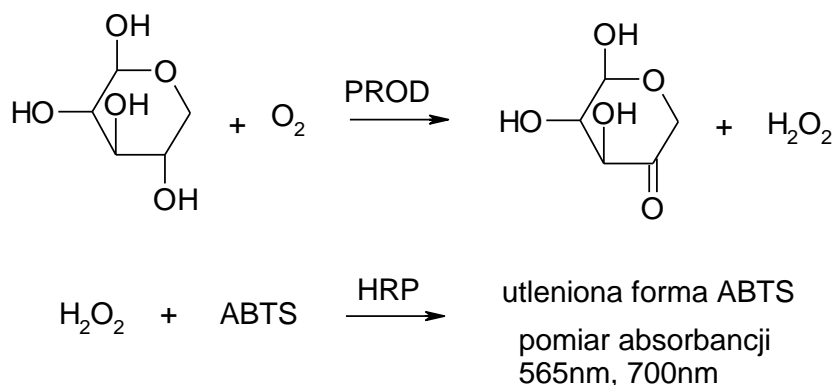
następnie w surowicy metodą chromatografii gazowej w sprzężeniu ze spektrometrem mas (GC-MS, *Gas chromatography–mass spectrometry*) [68].

1.3.3.1. Metody enzymatyczne

Większość metod enzymatycznego oznaczania 1,5-AG opiera się na jego utlenieniu w reakcji katalizowanej przez oksydazę pyranozy (PROD, *pyranose oxidase*, EC 1.1.3.10) a następnie spektrofotometrycznym pomiarze absorbancji barwnego produktu, powstającego w reakcji utlenienia chromogenu ABTS z nadtlenkiem wodoru:



lub



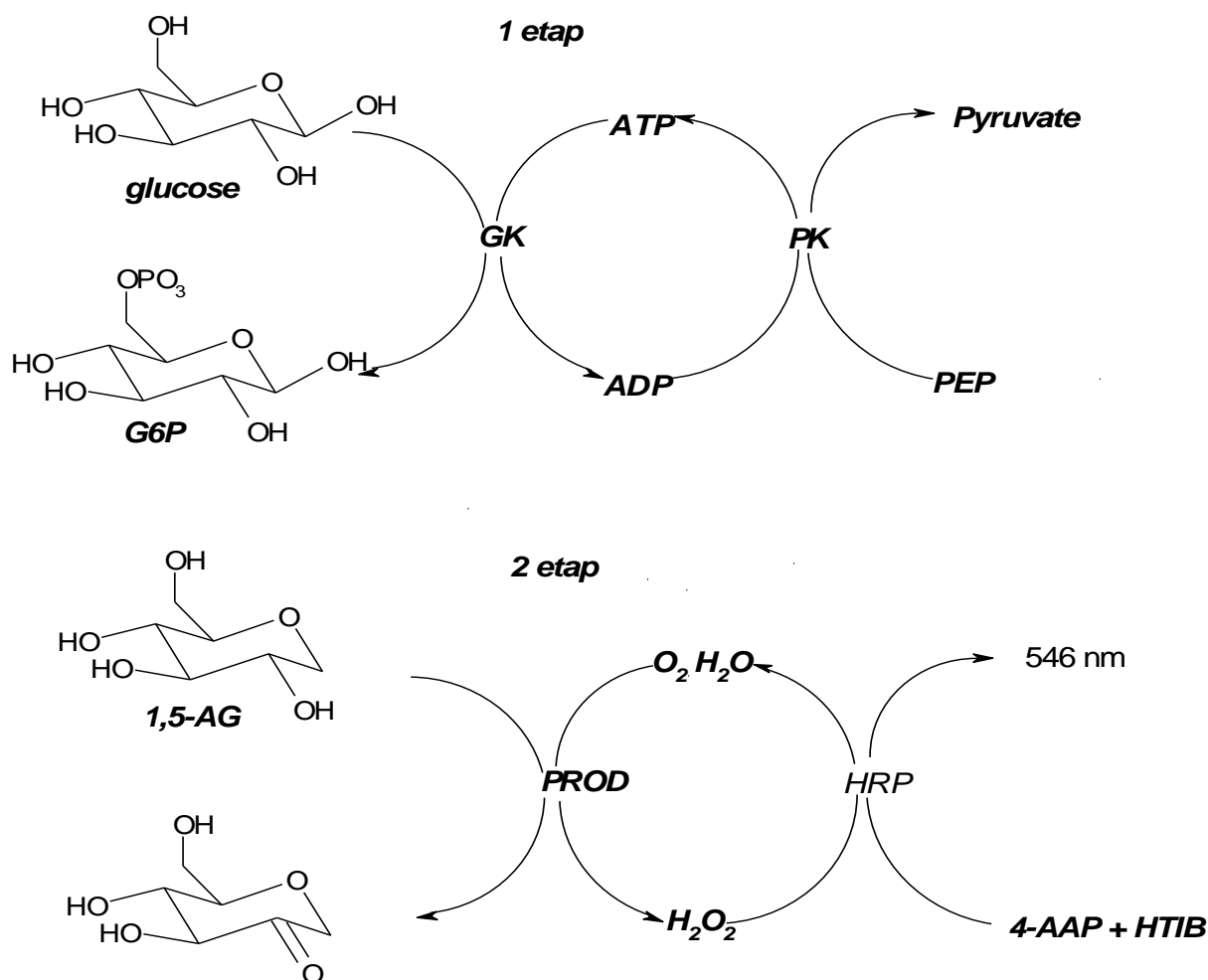
Enzym ten wykazuje szeroką specyficzność wobec wielu cukrów i polioli ze strukturą piranozową, katalizuje utlenianie grupy OH w pozycji 2C pierścienia piranozowego m.in. D-glukozy, 1,5-AG, L-sorbozy, D-xylozy, D-galaktozy, D-mannozy, glukono- δ -laktonu. Ze względu na fakt, że ma on najwyższą aktywność wobec glukozy (kilkukrotnie wyższą niż wobec 1,5-AG) oraz że stężenie glukozy w surowicy może być 10^4 razy większe od stężenia 1,5-AG, konieczne jest jej całkowite usunięcie z badanej próbki. Poszczególne metody

wykorzystujące PROD do enzymatycznego utleniania 1,5-AG różnią się sposobem eliminacji glukozy. W najstarszej z nich, zaproponowanej przez Yabuuchi i wsp. [69] wykorzystuje się w tym celu ekstrakcję do fazy stałej (SPE, *Solid Phase Extraction*), której podstawą jest selektywna retencja glukozy i innych cukrów na żywicy anionowymiennej, na której nie adsorbują się polirole, w tym 1,5-AG. O skuteczności rozdziału 1,5-AG od glukozy decydują konkurencyjne, fizyczne oddziaływania międzycząsteczkowe z fazą stałą (wypełnieniem) w kolumnie. Stąd sposób przygotowania dwuwarstwowego wypełnienia oraz przeprowadzenia procedury ekstrakcji determinuje specyficzność oznaczenia. Skuteczność izolacji 1,5-AG tą metodą została potwierdzona w chromatograficznej analizie eluatu po ekstrakcji SPE [70]. Próbką była wcześniej poddana derywatywacji trójmetylochlorosilanem w celu otrzymania lotnej pochodnej, odpowiedniej dla analizy metodą chromatografii gazowej. Pomiar prowadzono w warunkach gradientu temperatury na kolumnie BP-1 o wymiarach 10 m x 0.5 mm. W ekstrakcie w początkowej objętości 0,8 ml nie stwierdzono ani 1,5-AG ani też myo-inozytolu, natomiast obydwa te anality były obecne po zebraniu kolejnej frakcji 1 ml ekstraktu z kolumny SPE. Granica pomiaru metody wynosiła 1,7 µg/ml (10 µmol/l), precyzja CV= 9,9% przy stężeniu 1,5-AG równym 1,7 µg/ml oraz 3,4-2,6% w zakresie stężeń powyżej 5 µg/ml. Yabuuchi i wsp. oszacowali granice detekcji na 1 µg/ml (6 µmol/L), z CV≤10% [53]. Dla porównania metody HPLC umożliwiają oznaczenie 1,5-AG na poziomie stężeń poniżej 0,2 µg/ml (1 µmol/L) [71].

Innym sposobem eliminacji glukozy z próbki surowicy jest jej fosforylacja wobec glukokinazy (GK, *glucokinase*, EC 2.7.1.2) prowadząca do niereaktywnego w reakcjach z PROD glukozy-6-fosforanu (G6P) [Rycina 1]. Reakcja ta wykorzystywana jest w metodzie enzymatycznego oznaczania 1,5-AG pod nazwą Lana-AG Kit (Nihon-Kayaku, Japan) a także GlycoMark (Tomen, USA) [72, 73, 74]. Do mieszaniny reakcyjnej wprowadza się dodatkowo układ składający się z adenozylo trójfosforanu (ATP, *adenosine triphosphate*) oraz kinazy

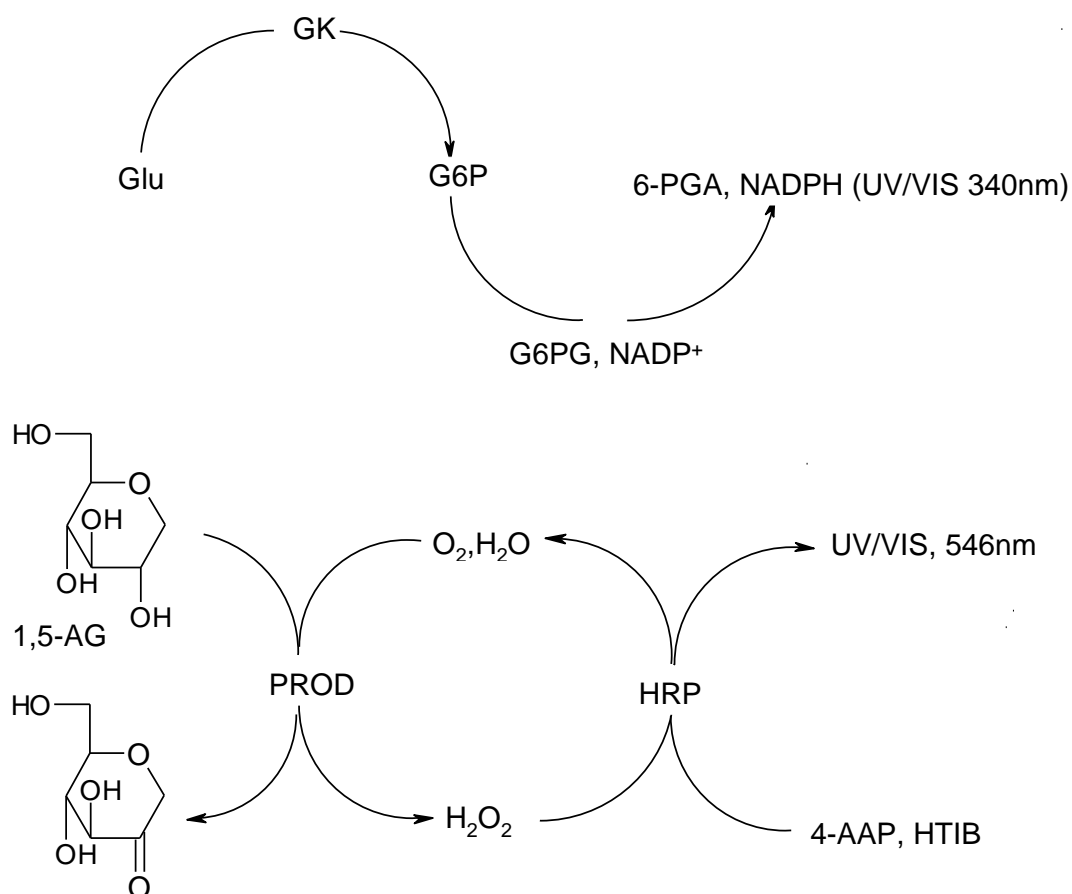
pirogronianowej (PK, *pyruvate kinase*) i fosfo-enolpirogronianu (PEP, *phosphoenolopyruvate*), które dodaje się w celu zwiększenia szybkości reakcji fosforylacji. Ograniczeniem metody jest koszt wynikający ze stosowania serii enzymów i wielu innych odczynników. Czułość analityczna metody wynosi 0,3-0,49 $\mu\text{g/ml}$, zakres liniowości krzywej kalibracyjnej do 110 $\mu\text{g/ml}$, precyzja (CV) i odzysk (dla stężenia 5 $\mu\text{g/ml}$) wynoszą odpowiednio: 3,83% i 102,2%. Stwierdzono następujący wpływ substancji interferujących: triglicerydy- w stężeniu 12,1 mmol/l, hemoglobina – 12,1 mmol/l, bilirubina – 911,4 $\mu\text{mol/l}$ [73,74].

Rycina 1. Etapy reakcji enzymatycznych wykorzystywanych w rutynowych metodach oznaczenia 1,5-AG w surowicy. Wg Fukumura Y et al. Fully enzymatic method for determining 1,5-anhydroglucitol in serum. Clin Chem (1994); 40: 2013-2016.



Jing i współpracownicy [74] zaproponowali modyfikację powyższej metody w celu jednoczesnego (w jednej kuwecie) oznaczenia glukozy i 1,5-AG [Rycina 2]. Glukozę, po fosforylacji wobec glukokinazy do G6P, przekształca się w kolejnym etapie, z udziałem dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu (G-6PD) do 6-PGA w celu spektrofotometrycznego oznaczenia stężenia glukozy (pomiar absorbancji przy długości fali 340/450 nm). Następnie do mieszaniny reakcyjnej wprowadza się PROD (pozostająca w mieszaninie 6-PGA nie reaguje z PROD) i na podstawie pomiaru absorbancji (po 5 min przy 540/700 nm) wyznacza się stężenie 1,5-AG (Rycina 2). Precyzja dla glukozy (dla stężenia 40 mg/dl) i 1,5-AG (dla stężenia 2,5 µg/ml) wynosiła odpowiednio: CV=1,8% oraz CV=2,7%, odzysk 100,2% i 101,6% [74].

Rycina 2. Etapy reakcji enzymatycznych wykorzystywanych w zmodyfikowanej metodzie oznaczenia 1,5-AG i glukozy w surowicy. Wg Jing et al et al: A novel fully enzymatic method for determining glucose and 1,5-Anhydro-D-glucitol in serum of one cuvette. Appl Biochem Biotechnol 2008, 150: 327-335.



Inną propozycją enzymatycznego oznaczenia 1,5-AG jest metoda Hamafuji i wsp. [75]. Właściwe oznaczenie polega również na utlenieniu 1,5-AG, lecz zamiast oksydazy pyranozy wykorzystuje się dehydrogenazę glukozy (G3DH, *glucose-3-dehydrogenase*). Enzym ten katalizuje utlenianie grupy hydroksylowej przy węglu C3 wielu cukrów, w tym 1,5-AG, glukozy, maltozy, cukrozy i innych. Jednakże większa aktywność tego enzymu wobec 1,5-AG, wynosząca 72% aktywności wobec glukozy, pozwala na większą czułość i użycie mniejszej ilości enzymu w oznaczeniu. Etapem poprzedzającym jest eliminacja cukrów będących substratami G3DH, w tym glukozy, maltozy, i cukrozy w reakcjach z serią enzymów. Glukoza

jest przekształcana w glukozy-6-fosforan przy pomocy heksokinazy (HK, *heksokinase*) oraz kinazy pirogronianowej; maltoza i cukroza ulegają degradacji pod wpływem α -glukozydazy i β -fruktozydazy. Wykazano jednak, że metoda ta prowadzi do otrzymania wyższych wartości stężeń 1,5-AG w porównaniu z oznaczeniem za pomocą metody Lana (Nippon-Kayachu) i aktualnie nie nadaje się do wdrożenia diagnostycznego. Autorzy jako przyczynę wskazują na szeroką specyficzną substratową G3DH, a w szczególności na obecną w surowicy N-karbamilo- β -D-glukopiranozyloaminę (NCG, *N-carbamoyl-B-D-glucopyranosylamine*). Problem specyficznosci wielosubstratowej dotyczy wielu innych badanych oksydaz i dehydrogenaz utleniających 1,5-AG, stąd też trwają prace nad poszukiwaniem enzymów o większej regio- i stereospecyficznosci oraz charakteryzujących się większą aktywnością wobec 1,5-AG.

Stosunkowo niedawno do oznaczeń 1,5-AG w surowicy oraz moczu została wprowadzona metoda ELISA (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) [76]. Zastosowanie metody ELISA nie wymaga selektywnego wyodrębniania 1,5-AG z surowicy, a opiera się wyłącznie na reakcji immunochemicznej ze specyficznym przeciwciałem. Generalną zaletą w kontekście zastosowania w diagnostyce medycznej jest stosunkowo krótki czas analizy oraz niski koszt pojedynczego oznaczenia, który z reguły kształtuje się na poziomie kilku PLN. Granica pomiaru metody wynosi 1,2 ng/ml-1 μ g/ml (dla różnych zestawów odczynnikowych), zakres liniowości do 50 μ g/ml [77].

1.3.3.2. Metody chromatograficzne

Pierwsze badania nad identyfikacją i oznaczeniem 1,5-AG przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografii gazowej, początkowo z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym FID (*Flame Ionization Detector*). W celu potwierdzenia identyfikacji 1,5-AG zastosowano spektrometr mas z jonizacją w strumieniu elektronów EI (*Electron Ionisation*)

oraz z jonizacją chemiczną i NH_3 jako gazem reakcyjnym [78]. Metody chromatografii gazowej (GC) wyróżniają się wysoką rozdzielczością, jednakże umożliwiają one rozdział i analizę takich substancji, które w warunkach chromatograficznych (tj. odpowiednio wysokiej temperaturze dozownika i kolumny) mają postać gazów lub par. Ze względu na liczne grupy polarne, cukry i poliole są mało lotne i nie odporne termicznie, stąd też do ich oznaczania metodą GC wymagane jest upochodnienie próbki. Procedura ta polega na zablokowaniu polarnych grup wodorotlenowych, np. w reakcjach metylacji, silylacji, acetylacji lub tworzenia octanów alditoli. W wyniku derywatywacji uzyskuje się zwiększenie rozdzielczości pochodnych cukrów, zwiększenie czułości i selektywności oznaczeń. Z drugiej strony, znacznie wydłuża się czas analizy co ogranicza zastosowanie metody w rutynowej diagnostyce medycznej. Najbardziej powszechną metodą derywatywacji jest przekształcenie cukrów w pochodne trimetylosililowe (TMS; $-\text{OH} \rightarrow \text{OTMS}$). Taki sposób przygotowania próbki surowicy zastosował Yoshioka i wsp. [68] w procedurze identyfikacji i oznaczenia 1,5-AG w grupie 342 zdrowych osób. W analizie chromatograficznej na kolumnie kapilarnej (20mx0,25mm) [Tabela 4] uzyskał on dobry rozdział obecnych w próbce trimetylosililowych pochodnych cukrów, jednak sam czas przygotowania próbki zajmował kilka godzin. W analogicznej technice chromatograficznej (GC z detektorem FID) do oznaczenia 1,5-AG w znacznie większej niż poprzednio grupie 535 pacjentów (108 chorych na cukrzycę, 200 z zaburzeniami metabolicznymi takimi jak np. marskość wątroby, endokrynopatie, choroby przewodu pokarmowego oraz 227 osób w grupie kontrolnej) Yamanouchi i wsp. [78] zastosowali prostszą i szybszą acetylację, używając bezwodnika kwasu octowego. Dodatkowo, w celu skrócenia czasu analizy, zmienili warunki rozdziału chromatograficznego [Tabela 4]. Precyzja oznaczeń tą metodą wynosiła $\text{CV} = 1,4\%$ [78,79]. Z kolei Tetsuo i wsp. [80] oznaczając 1,5-AG podobną metodą chromatograficzną (GC-FID) w grupie o dużej liczebności (543 kobiet w fizjologicznej ciąży, 75 ciężarnych z GDM lub PGDM) zastosowali parametry

rozdziłu chromatograficznego oraz sposób przygotowania próbki, które wydłużały czas analizy, lecz gwarantowały osiągnięcie większej selektywności i czułości [80]. Ponieważ wysokie stężenie glukozy w stosunku do 1,5-AG utrudnia rozdział chromatograficzny po deproteinizacji dodatkowo izolowano glukozę. Wykorzystano w tym celu ekstrakcję do fazy stałej (SPE) z żywicą kationowymienną, następnie przeprowadzano derywatyzację TMS i ekstrakcję produktów derywatywacji heksanem. Czułość metody wynosiła 1 µg/ml przy CV= 5,5%.

Połączenie chromatografii ze spektrometrią mas (GC-MS) stosowano również do jednoczesnej identyfikacji i analizy profilu cukrów i polioli, mające na celu wyjaśnienie metabolizmu oraz ich fizjologicznego i klinicznego znaczenia. Badania tego typu w soczewkach z zaćmą pacjentów z T1DM i w grupie kontrolnej bez cukrzycy przeprowadzili Yoshioka i wsp. [81]. Stwierdzili oni wyższe stężenie glukozy, sorbitolu, fruktozy, mannitolu oraz adonitolu u chorych z cukrzycą w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast obniżone było stężenie 1,5-AG i myo-inozytolu. Jednocześnie wykazali oni obecność w próbce innych stereoizomerów cukrów, których pików nie udało się zidentyfikować. Szereg nowych markerów (4-deoksyerytritol, 5-deoksy ksylitol, 5-deoksyarabitol, 5-deoksyrybitol, 6-deoksymannitol, 6-deoksygalacitol) zidentyfikował metodą GC-MS Niwa [82], w oznaczeniach surowicy i moczu pacjentów z niewydolnością nerek.

Podstawową trudnością w analizie profilu monosacharydów metodą GC-MS jest powstanie podczas derywatywacji dla każdego ze składników, szeregu pików reprezentujących ich α -, β - piranozowe oraz α -, β - furanozowe struktury. Komplikuje to ich identyfikację na podstawie widma mas. W celu ominięcia tego problemu Pitkanen i wsp. [83] oznaczając stężenia mannozy, fruktozy, mannitolu oraz 1,5-AG przeprowadzili w pierwszym etapie redukcję grupy aldehydowej mannozy i fruktozy, stosując jako czynnik redukujący borodeuterek sodu. Podczas tej reakcji zachodzi selektywne znakowanie atomu węgla

pierwotnego ugrupowania aldehydowego. Następnie zastosowali acetylację otrzymanych alditoli, tj., 1-D-mannitolu, 2-D-mannitolu oraz występujących w próbce nieznakowanego izotopowo mannitolu i 1,5-AG [83, 84]. Precyzja oznaczeń (CV) wynosiła odpowiednio - dla mannozy 2,4%, fruktozy – 10,6%, 1,5-AG – 5,3%.

W ostatnim okresie coraz częściej w oznaczeniach różnych cukrów i polioli wykorzystywana jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC, *High-performance liquid chromatography*) z różnymi sposobami pomiaru, a głównie spektrofotometrycznym (UV-VIS), fluorescencyjnym oraz w sprzężeniu ze spektrometrią mas (LC-MS) i tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Metoda ta jest bardziej uniwersalna ze względu na możliwości analizy substancji o większej masie cząsteczkowej, większej polarności, mniejszej stabilności termicznej. Ponadto jest ona szybsza, gdyż nie jest konieczna derywatywacja próbki. Wyjątek stanowi wariant z detekcją spektrofotometryczną lub fluoroscencyjną, gdzie należy zmodyfikować strukturę cukrów przez utworzenie ugrupowania chromoforowego lub fluoroforowego warunkującego detekcję tych związków. W rozdziale chromatograficznym polarnych i hydrofilowych związków do jakich należą monosacharydy najczęściej stosuje się polarne fazy stacjonarne w technice normalnych faz lub oddziaływań hydrofilowych (HILIC, *Hydrophilic Interaction Chromatography*). W coraz częściej stosowanych połączeniach chromatografii cieczowej z detektorem mas, stosuje się rejestracje widm w trybie jonów ujemnych w jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI, *Atmospheric-pressure chemical ionization*) lub przez elektrorozpylanie (ESI, *Electrospray ionization*). Na przykład Niwa [85] zaproponował szybką metodę oznaczenia polioli (1,5-AG, myo-inozytolu, erytrytolu, mannitolu, sorbitolu) u pacjentów z cukrzycą z wykorzystaniem LC-MS-APCI, poprzez monitorowanie jonu 1,5-AG w postaci jego adduktu chlorkowego. Z próbki surowicy po odbiałczeniu etanolem izolowano glukozę metodą ekstrakcji do fazy stałej, stosując dwuwarstwowe wypełnienie kolumnienki ekstrakcyjnej z żywicy kationo- i anionowymiennej

[Tabela 4]. Równolegle oznaczono 1,5-AG metodą enzymatyczną [69]. Stwierdzono zgodność wyników obu metod u chorych z cukrzycą i prawidłową funkcją nerek, natomiast u chorych z niewydolnością nerek wyniki oznaczenia 1,5-AG metodą enzymatyczną były zawyżone w porównaniu do LC-MS z powodu dużego stężenia myo-inositolu w próbce, będącego w tej metodzie substancją interferującą. Z tego też względu u chorych z upośledzoną funkcją nerek preferowane jest bardziej specyficzne oznaczenie metodą chromatograficzną. Limit detekcji metody wynosił 0,2 µg/ml (1 µmol/l), precyzja CV=7,2% i 9,2% (przy stężeniach 1,5-AG odpowiednio 2,6 µg/ml oraz 30 µg/ml).

Katayama i wsp. [86] oznaczali cukry (D-glukoza, D-galaktoza, D-mannoza, sukroza, arabinoza, 1,5-AG, ksylitol, sorbitol, mannitol, myo-inozytol, erytritrol) w surowicy prostszą metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną, osiągając zbliżoną czułość do oznaczeń metodą GC-MS [86]. Limit detekcji dla cukrów wynosił odpowiednio: arabinoza i D-galaktoza – 10 µg/ml; D-glukoza i D-mannoza – 20 µg/ml, sukroza - 80 µg/ml, (nie pojawiły się na chromatogramie piki fukozy, fruktozy, D-laktozy), natomiast dla polioli: 1,5-AG, ksylitol, sorbitol i erytritrol –10 ng/ml, mannitol – 800 ng/ml, myo-inozytol – 1000 ng/ml. Metoda wymaga jedynie przekształcenia oznaczanych składników w pochodne fluorescencyjne w prostej do przeprowadzenia reakcji z kwasem benzoesowym.

W oznaczeniach stężenia 1,5-AG na poziomie poniżej 100 ng/ml stosowana jest chromatografia cieczowa w sprzężeniu z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Zapewnia ona 20-100 razy większą czułość w porównaniu do LC-MS i dodatkowo dostarcza informacji o strukturze analizowanych związków. Przykładem oznaczenia stężenia 1,5-AG tą metodą jest procedura przedstawiona przez Ornato i wsp. [88]. Analizę ilościową wykonywano w eksperymencie monitorowania wybranych reakcji fragmentacji (SRM, *Selective Reaction Monitoring*) przy pomocy spektrometru masowego z jonizacją chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym. Precyzja metody wynosiła 3,4 - 16% (przy stężeniach 1,5-AG 2500 ng/ml

oraz 150 ng/ml), natomiast granica oznaczalności 50 ng/ml. Innym przykładem zastosowania metody LC-MS/MS są badania stężenia 1,5-AG w surowicy krwi u chorych na cukrzycę [89]. W zaproponowanej, szybkiej procedurze stosowano spektrometr mas z potrójnym kwadrupolem, pracujący w trybie ujemnej jonizacji w elektrospreju (ESI) oraz rejestrowania wybranej fragmentacji SRM [89]. Rozdział chromatograficzny realizowano na kolumnie (150mmx2.0mm, ID 5µm) z wypełnieniem amidowym oraz z fazę ruchomą acetonitryl-woda. Czas analizy tą metodą wynosił 5 min. Precyzja oznaczeń (CV) wynosiła 9,8% dla stężenia 1,5-AG poniżej 2 µg/ml (10 µmol/L).

Tabela 4. Warunki rozdziału chromatograficznego stosowane dla 1,5-AG i innych cukrów oraz polioli.

Nazwa techniki i skrót stosowany w literaturze	Autorzy metody, rok	Parametry metody	Procedura przygotowania próbki
Chromatografia gazowa (GC) z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID)	Yoshioka, 1982, 1983 [68]	detektor: płomieniowo-jonizacyjny (FID), kolumna kapilarna: 20m×0.25mm, faza stacjonarna: OV-101, gaz nośny: azot, 50ml/min, program temperaturowy kolumny: 120°C, 0.5°C/min, 195°C/min	1.deproteinizacja etanolem 2.derywatywacja TMS
Chromatografia gazowa ze spektrometrią mas (GC-MS)	Yoshioka,1982 [78]	sposób jonizacji: strumień elektronów EI oraz chemiczna z NH ₃ , analizator: kwadropolowy kolumna: 1m×2mm, faza stacjonarna: 15% JXR (metylosilikon), temperatura kolumny: 160°C, gaz nośny: hel, 15ml/min	1.deproteinizacja etanolem 2.derywatywacja TMS
Chromatografia gazowa (GC)	Yamanouchi, 1987, 1988 [78, 79]	kolumna: 2m×2,2mm, faza stacjonarna: SP 2340 Chromosorb W temperatura kolumny: 203°C, IS - ksylitol	1.deproteinizacja metanolem 2. ekstrakcja w układzie woda/chloroform 2.derywatywacja (acetylacja) 3.ekstrakcja eterem
Chromatografia gazowa (GC) z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID)	Tetsuo, 1990 [80]	Kolumna kapilarna: 25m× 0.24mm faza stacjonarna: SE-30, gaz nosny: azot, program temperaturowy: 130°- 160C, 2°C/min, 160°C/min IS adonitol	1.deproteinizacja etanolem, 2.ekstrakcja do fazy stałej SPE (żywica kationowymienna) 3.derywatywacja TMS 4.ekstrakcja heksanem
GC/MS	Yoshioka,1991 [81]	Brak informacji w publikacji	
GC-MS-EI	Pitkänen, 1994 1996 [83, 84]	Brak informacji w publikacji	1.redukcja borowodorkiem sodu 2.acylacja bezwodnikiem octowym
GC-MS/MS	Katavama, 2008 [86]	kolumna 4.6x 250 mm, 5µm, faza stacjonarna amidowa	1.derywatywacja kwasem benzooesowym
LC-MS-APCI	Niwa,1994 [85]	kolumna 150x6mm, faza stacjonarna: styren-dwuwinylbenzen z jonami cynku, 80°C	1.deproteinizacja etanolem 2.eliminacja glukozy, SPE
HPLC- MS/MS	Onorato, 2008 [88]	rozdzielanie chromatograficzne w technice oddziaływań hydrofilowych HILC; spektrometr tandemowy MS/MS z kolizyjnie indukowaną dysocjacją CID	

1.4. Potencjalne znaczenie kliniczne oznaczeń 1,5-AG w ciąży

Pomimo licznych potencjalnych zalet zastosowania 1,5-AG w monitorowaniu T1DM u ciężarnych - krótkoterminowy charakter oceny glikemii, wysoka czułość względem glikemii poposiłkowej, szybka zmienność pod wpływem leczenia - istnieją rozbieżne opinie w tej kwestii.

W przypadku ciąży powikłanej T1DM można wskazać dodatkowe czynniki wpływające na stężenie 1,5-AG. Po pierwsze, jak już wspomniano, ciąża należy do tych sytuacji klinicznych, w których próg nerkowy dla glukozy jest obniżony, co nasila stopień glikozurii i obniża poziom 1,5-AG w surowicy krwi [65]. W opinii ekspertów i zaleceniach FDA, zastosowanie 1,5-AG jako markera wyrównania metabolicznego w takiej sytuacji wymaga ostrożności, definitywnie też dyskwalifikuje go jako narzędzie w procesie diagnostycznym cukrzycy w ciąży [87]. Z drugiej strony, docelowe rekomendowane poziomy glukozy w ciąży powikłanej cukrzycą są znacznie ostrzejsze niż u innych chorych na cukrzycę, co powinno skutkować wzrostem poziomu omawianego markera we krwi w porównaniu do innych pacjentów.

Stężenie 1,5-AG w fizjologicznej ciąży spada adekwatnie do obniżających się wartości progu nerkowego dla glukozy. Próg ten jest najczęściej wymienianym w literaturze istotnym predyktorem stężeń 1,5-AG w ciąży niepowikłanej cukrzycą. Najwyższe wartości 1,5-AG obserwowano w I trymestrze ciąży (18 $\mu\text{g/ml}$), od 9 tygodnia ciąży obniżały się one osiągając najniższą wartość pod koniec III trymestru (10,2 $\mu\text{g/ml}$) [80]. Z drugiej strony, wartości stężenia 1,5-AG w ciąży powikłanej cukrzycą były dwukrotnie niższe w porównaniu do grupy bez cukrzycy i wynosiły 4,6 $\mu\text{g/ml}$ w PGDM i 5,5 $\mu\text{g/ml}$ w GDM [80]. Obniżone stężenie 1,5-AG poniżej 10 $\mu\text{g/ml}$ występowało u 30% ciężarnych w fizjologicznej ciąży i 90% ciężarnych z cukrzycą. Należy podkreślić, że w przeciwieństwie do grupy kontrolnej, w ciąży powikłanej cukrzycą nie wykazano wpływu czasu trwania ciąży na wartość stężenia 1,5-AG w surowicy [80].

Stosunkowo szybka zmienność poziomu 1,5-AG pod wpływem leczenia jest dodatkowym czynnikiem, który może czynić go wartościowym narzędziem w monitorowaniu wyrównania metabolicznego w ciąży, dostarczającym bieżącej informacji o skuteczności podjętej interwencji terapeutycznej. Do chwili obecnej przeprowadzono tylko jedno badanie, które oceniało możliwość zastosowania 1,5-AG u ciężarnych z GDM i PDGM [90]. Przyniosło ono zachęcające wyniki wykazując, że 1,5-AG koreluje z wartościami glikemii mierzonej w SMBG - średnim poziomem glukozy i maksymalnym poziomem glukozy (wyrażonym za pomocą wskaźnika M). Dla stężeń w zakresie od 3 $\mu\text{g/ml}$ do 27 $\mu\text{g/ml}$, zależność pomiędzy 1,5-AG a średnią glikemii w profilu dobowym wynosiła $r=-0,3$ ($p<0,05$) oraz $r=-0,36$ ($p<0,05$) dla maksymalnej glikemii estymowanej na podstawie wskaźnika M (wg. Schlichtkrulla). Opisana zależność pozostała znamienne po uwzględnieniu dodatkowych czynników - glikemii rejestrowanej glukometrem, wieku ciężarnej, a także czasu trwania ciąży. We wspomnianym badaniu nie rozróżniano jednak typu cukrzycy przedciążowej (T1DM, T2DM), analizowana grupa była nieliczna (55 ciężarnych), a korelowane z 1,5-AG parametry (maksymalna i średnia glikemia) były prostymi wskaźnikami glikemii, nie zaś parametrami uwzględniającymi najnowsze osiągnięcia technologiczne, na przykład CGMS.

Można więc formułować hipotezę, że 1,5-AG stanowi potencjalnie użyteczny marker glikemii w ciąży powikłanej T1DM. Ważnym uzasadnieniem niniejszej pracy doktorskiej jest potencjalna możliwość zastosowania jej wyników w praktyce klinicznej. W tym kontekście warto jeszcze raz podkreślić potencjalne korzyści wynikające z zastosowania 1,5-AG jako markera wyrównania metabolicznego u ciężarnych z T1DM. Po pierwsze, możliwość oceny poprawy lub pogorszenia wyrównania metabolicznego w okresie ostatnich 1-2 tygodni przed badaniem. Po drugie, odzwierciedlenie glikemii poposiłkowej wynikające z jej szczególnego wpływu na poziom 1,5-AG. W końcu, dostępność szybkiej i taniej metody oznaczenia. Kwestia

przydatności tego markera w ciąży powikłanej T1DM jest więc ważnym problemem badawczym.

2. CELE PRACY

Celem niniejszej pracy jest ocena przydatności 1,5-AG jako markera wyrównania metabolicznego w ciąży powikłanej T1DM.

Cele szczegółowe pracy obejmowały:

1. Ocena stężenia 1,5-AG u ciężarnych z T1DM oraz w ciąży fizjologicznej
2. Analizę korelacji między stężeniem 1,5-AG oraz HbA_{1c} a parametrami wyrównania metabolicznego uzyskanymi na podstawie dobowego profilu glikemii oraz CGMS
3. Ocena użyteczności klinicznej 1,5-AG jako markera glikemii poposiłkowej
4. Poszukiwanie związku pomiędzy poziomem 1,5-AG a masą urodzeniową dziecka w porównaniu z innymi metodami monitorowania glikemii
5. Ocena wartości klinicznej 1,5-AG jako markera ryzyka makrosomii i LGA

3. METODYKA

3.1. Badana grupa

Dla badań kwalifikowano ciężarne z T1DM leczone w Poradni Diabetologicznej Kliniki Chorób Metabolicznych Szpitala Uniwersyteckiego (SU) w Krakowie. Kryterium włączenia ciężarnej stanowiła T1DM zdiagnozowana przynajmniej rok przed zajściem w ciążę. Z badania wykluczono kobiety z ciążą mnogą, przewlekłymi chorobami wątroby, a także w przypadku wystąpienia poronienia. Żadna z kobiet włączonych do badania nie miała III lub wyższego stopnia niewydolności nerek. Do grupy kontrolnej włączono ciężarne bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej, u których wykluczono GDM zgodnie z algorytmem i kryteriami Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego [4]. Grupa kontrolna była rekrutowana wśród pacjentek Kliniki Ginekologii i Położnictwa SU oraz pacjentek Szpitala im. Babińskiego w Krakowie.

Na podstawie zdefiniowanych powyżej kryteriów do badania zakwalifikowano 212 kobiet ciężarnych, w tym 110 pacjentek w ciąży powikłanej T1DM oraz 102 osoby z grupy kontrolnej. Dla badanej grupy kobiet z T1DM, zebrano informacje odnośnie wyrównania glikemii w okresie poprzedzającym pobranie próbki. Ponadto w oparciu o dokumentację medyczną uzyskano dane dotyczące ich podstawowej charakterystyki klinicznej. U wszystkich ciężarnych z T1DM zostały zebrane informacje co do sposobu rozwiązania ciąży oraz dane dotyczące stanu noworodka. Odnotowywano także obecność wad wrodzonych u płodu.

Charakterystykę kliniczną kobiet z T1DM oraz grupy kontrolnej przedstawia Tabela 5. W grupie z T1DM średni wiek w momencie włączenia do badania wynosił 29 lat, średni czas trwania cukrzycy wynosił około 12 lat. Pacjentki z T1DM charakteryzowały się zróżnicowaną klasą cukrzycy w chwili badania, ponad połowa z nich należała do klasy B. Użycie osobistych pomp insulinowych i metody ciągłego podskórnego wlewu insuliny (*Continuos Subcutaneus Insulin Infusion* - CSII) u większości osób wynikało z aktualnie przyjętych standardów w leczeniu T1DM w ciąży oraz praktyki klinicznej w Klinice Chorób Metabolicznych. Pacjentki

charakteryzowały się prawidłową masą ciała przed ciążą (średnie BMI - 24,9 kg/m²). U 10 % kobiet występowało przed ciążą nadciśnienie tętnicze. Średnia urodzeniowa masa ciała noworodków matek z T1DM wynosiła 3506 g. LGA stwierdzono u 27 noworodków (33% badanej grupy) matek z T1DM, z czego u 21 płodów wystąpiła makrosomia. Dane kliniczne dla grupy kontrolnej uzyskano na podstawie przeprowadzonych badań ankietowych. Wśród kobiet bez cukrzycy, u 5 występowało nadciśnienie tętnicze przed ciążą. Średni wiek kobiet z grupy kontrolnej w momencie zajścia w ciążę wynosił 27,7 lat, średnie BMI przed ciążą wynosiło 25,4 kg/m².

Tabela 5. Charakterystyka kliniczna ciężarnych z T1DM oraz grupy kontrolnej.

Cecha	T1DM (n=110)	Ciężarne bez cukrzycy (n=102)
Wiek w momencie badania [lata]: średnia; SD	29,4; 4,2	27,7; 5,1
Wiek rozpoznania cukrzycy [lata]: średnia; SD	18; 3,3	Nie dotyczy
Czas trwania cukrzycy [lata]: średnia; SD	11,5; 4,5	Nie dotyczy
BMI przed ciążą [kg/m ²]: średnia; SD	24,9; 3,9	25,4; 4,1
Masa przed ciążą [kg]: średnia; SD	65,9; 13,3	69,1; 15
Wzrost [m], średnia, SD	165; 6,2	166; 7
Nadciśnienie tętnicze [%]	10	4,5
Planowanie ciąży [%]	65	Brak danych
Makrosomia [%]	25	Brak danych
Leczenie CSII [%]	96	Nie dotyczy
Średni tydzień porodu: średnia; SD	40,9; 4,1	Brak danych
Klasa cukrzycy [%]		Nie dotyczy
B	65	Nie dotyczy
C	17	Nie dotyczy
D	14	Nie dotyczy
RF	3	Nie dotyczy
Masa położnicza [g]: średnia, SD	3506; 655,8	Brak danych

3.2. Ocena wyrównania metabolicznego

W grupie pacjentek z T1DM oceniano następujące parametry wyrównania metabolicznego:

- pomiar poziomu 1,5-AG w surowicy krwi: u 80 pacjentek po jednym oznaczeniu w każdym trymestrze
- poziom HbA_{1c} oznaczany w tym samym okresie co 1,5-AG
- 8-punktowy profil dobowy wykonany za pomocą glukometru w okresie 1 tygodnia przed wizytą, na której został pobrany materiał do oceny 1,5-AG
- u 58 pacjentek z T1DM wykonano zapis za pomocą CGMS obejmujący okres 7 dni bezpośrednio poprzedzających pobranie krwi do oznaczeń 1,5-AG i HbA_{1c}

3.2.1. Metodyka oznaczeń stężenia 1,5-AG

Stężenie 1,5-AG oznaczano metodą ELISA przy zastosowaniu komercyjnych zestawów firmy Cusabio Biotechnology przeznaczonych do oznaczeń w ludzkiej surowicy i osoczu. Metoda wykorzystuje monoklonalne przeciwciała przeciwko 1,5-AG.

Próbka surowicy o objętości 50 µl została umieszczona na płytce opłaszczonej przeciwciałem wychwytyjącym, natomiast roztwory standardów 1,5-AG zostały umieszczone w dwóch powtórzeniach. Próbkę następnie inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37 stopni z roztworem odczynnika zawierającego przeciwciała detekcyjne sprzężone z biotyną. 1,5-AG obecny w próbkach badanych i standardach wiązał się z przeciwciałami opłaszczonymi na płytce oraz z przeciwciałami znakowanymi tworząc kompleks typu "sandwich". Po tym czasie płytkę przemywano dwukrotnie 0,5 ml roztworu płuczącego celem usunięcia z roztworu niezwiązanych przeciwciał. Następnie przeprowadzono inkubację ze streptawidyną oraz substratem dla peroksydazy - tetrabenzydynam (TNB, *tetrabenzidina*). Po godzinie inkubacji przerywano reakcję enzymatyczną 2M roztworem kwasu siarkowego. Wielkość absorbancji w każdej studziencie była proporcjonalna do stężenia 1,5-AG w roztworach standardów i

próbkach badanych. Absorbancję mierzono przy pomocy urządzenia Benchmark Microplate Reader firmy Bio-Rad przy długości fali 450 nm. Wartości stężeń 1,5-AG w próbkach obliczano na podstawie krzywej kalibracyjnej uzyskanej dla odpowiednich wzorców. Precyzję wewnątrz- i między- seriami (*intra i inter assay variability*) oceniano odpowiednio na podstawie 10 powtórzonych pomiarów dla próbek surowicy o stężeniach 2,5 i 4,3 µg/ml. Współczynnik zmienności wewnątrz seryjnej wynosił poniżej 2% (CV<2%), natomiast współczynnik zmienności między seriami był niższy niż 5% (CV<5%). Kontrolowano również stabilność 1,5-AG w surowicy, w zależności od warunków przechowywania materiału do badań (temperatura, czas przechowywania).

3.2.2. Metodyka oznaczeń HbA_{1c}

Oznaczenie stężenia HbA_{1c} wykonano we krwi pełnej pobranej do próbki z antykoagulantem (EDTA). Poziom HbA_{1c} oznaczano w Pracowni Biochemicznej Kliniki Chorób Metabolicznych SU przy zastosowaniu metody HPLC, na analizatorze Variant II (BioRad Laboratories, USA). Zastosowana metoda jest certyfikowana przez Krajowy Program Certyfikacji Glikohemoglobiny.

3.2.3. Pomiar dobowych profili glikemii

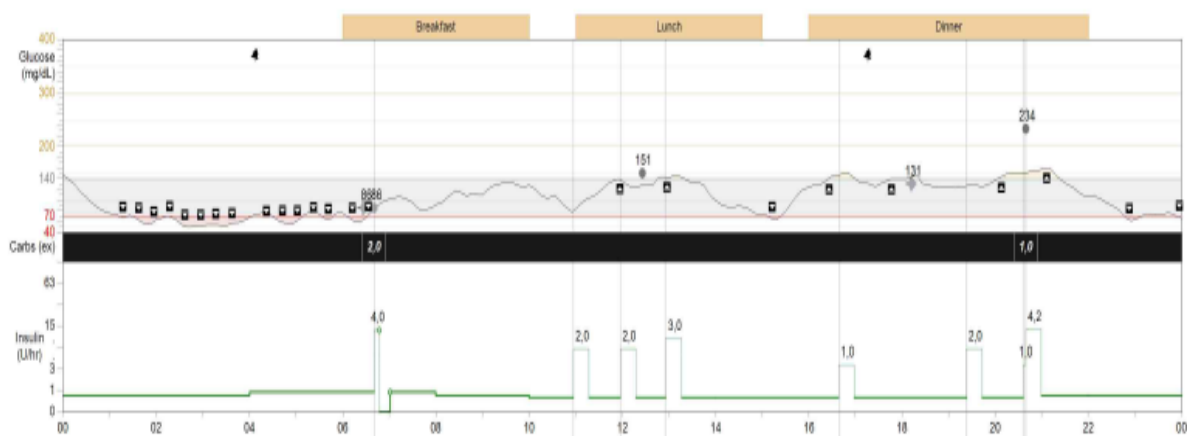
W ramach samokontroli glikemii wszystkim pacjentkom z T1DM zalecono pomiar i zapisywanie dobowych profili glikemii wykonywanych za pomocą glukometru. Ponadto u 58 pacjentek z T1DM użyto referencyjnej metody zapisu glikemii za pomocą CGMS urządzeniem rejestrującym stężenie glukozy w czasie rzeczywistym - GuardianRT (Medtronic, MiniMed, USA). System ten umożliwia ciągłą, dokładną rejestrację glikemii z uwzględnieniem oceny długości i nasilenia hipo- i hiperglikemii. Pozwala to na obliczenie bardziej precyzyjnych współczynników charakteryzujących średnią glikemię, maksymalną glikemię a także zmienność w stężeniu glukozy.

W skład urządzenia CGMS wchodzi sonda z elektrodą platynową pokryta oksydazą glukozy, rejestrująca stężenie glukozy w płynie śródtkankowym. Sygnał z elektrody wysyłany jest z detektora co 10 sekund, dokonując zapisu uśrednionych wartości glikemii co 5 minut przez okres 7 dni. Po tym czasie dane zapisane w pamięci aparatu przenosi się do komputera celem ich przetworzenia w postać graficzną. Wyniki przedstawiane są w postaci krzywej obrazującej poziomy glikemii i dawki insuliny w funkcji czasu wyrażonego w minutach. Na wykresie zaznaczony jest również poziom docelowy glikemii (w mg/dl) zdefiniowany za pomocą poziomych linii wraz z dopuszczalnym zakresem wahań.

W takiej formie dane poddawano analizie za pomocą oprogramowania firmy Medtronic (Medtronic Solutions Software), która obejmowała ocenę:

- średnich dobowych glikemii (MBG, *mean blood glucose*)
- średnich maksymalnych glikemii (MMBG, *mean maximal blood glucose*)
- odchylenia standardowego glikemii (SD)
- pola nad krzywą dla glikemii wynoszącej 140 mg/dl (140-AUC)
- pola pod krzywą dla glikemii poniżej 56 mg/dl (56-AUC)
- czasu trwania hiperglikemii

Rycina 3. Przykładowy zapis CGMS.



Dobowy profil glikemii został przeprowadzony samodzielnie przez wszystkie ciężarne w oparciu o codzienny pomiar glukozy we krwi włosniczkowej dokonywany glukometrem. Zgodnie z zaleceniami PTD pacjentki oznaczały glikemię na czczo, 2 godziny po posiłku oraz w nocy. Kalibrację pomiarów glukometrem przeprowadzono w odniesieniu do stężeń glukozy oznaczanych metodą laboratoryjną. Stężenie glukozy w warunkach laboratoryjnych oznaczano metodą enzymatyczną GOD-PAP (*Glucose Oxidase-Phenol 4-Aminophenazone Peroxidase*) z materiału pobranego do próbki zawierającej fluorek sodu - inhibitor glikolizy. Oznaczenia wykonano w Zakładzie Biochemii Klinicznej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie na aparacie Hitachi 917.

3.3. Ocena danych położniczych u ciężarnych z T1DM.

U 86 ciężarnych z T1DM zostały zebrane informacje co sposobu rozwiązania i tygodnia zakończenia ciąży, masy noworodka oraz jego skali Apgar. Z analizy wykluczono kobiety w ciąży bliźniaczej.

LGA zdefiniowano jako masa urodzeniowa powyżej 90 percentyla dla danego tygodnia porodu. Określono ją na podstawie siatek centylowych dla populacji polskiej

wystandaryzowanych względem płci dziecka i tygodnia porodu [91]. Makrosomię definiowano jako masę urodzeniową noworodka przekraczającą 4000g.

3.4. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Zmienne ilościowe o rozkładzie normalnym porównywano za pomocą testu t-Studenta oraz wieloczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). W odniesieniu do zmiennych nie wykazujących rozkładu normalnego zastosowano nieparametryczny test U Manna-Whitney'a. Zależność pomiędzy 1,5-AG a pozostałymi wskaźnikami wyrównania metabolicznego wyrażono za pomocą współczynników korelacji Pearsona. Zmienne o rozkładzie odmiennym od normalnego logarytmowano. Wyliczono parametry regresji liniowej dla 1,5-AG i wartości glikemii uzyskanych w zapisie CGMS oraz rejestrowanych przy użyciu standardowych metod monitorowania (HbA_{1c} , profil dobowy glikemii).

Do celów analizy związku z wynikiem położniczym ciąży dokonano analiz wieloczynnikowych za pomocą regresji liniowej oraz regresji logistycznej. Obliczenia statystyczne wykonano w programie Statistica 9.0 (StatSoft). Ocenę przydatności klinicznej 1,5-AG w ocenie ryzyka makrosomii i LGA przeprowadzono przy użyciu modułu *ROC curve analysis (Register Operating Curve Analysis)* za pomocą oprogramowania MedCalc ver 12.1.2. Wartość $p < 0.05$ stanowiła przyjęty próg statystycznej znamienności.

Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej. Wszystkie pacjentki zostały pisemnie poinformowane o celach i protokole badania. Uzyskano ich pisemną zgodę na udział w projekcie. Zgodę na przeprowadzenie badania wyraziła Komisja Bioetyczna UJ (numer opinii KBET/70/B/2008).

4. WYNIKI BADAŃ

4.1. Poziom 1,5-AG w badanych grupach kobiet

Średnie stężenie 1,5-AG w badanej grupie pacjentek z T1DM wynosiło 5,1 $\mu\text{g/ml}$ (mediana 4,23 $\mu\text{g/ml}$, zakres: 2,4 – 10,8 $\mu\text{g/ml}$). Średnie stężenie tego markera w ciąży fizjologicznej (grupa kontrolna) wynosiło 12,79 $\mu\text{g/ml}$ (mediana: 10,9 $\mu\text{g/ml}$, zakres: 4,2-18,8 $\mu\text{g/ml}$) i było istotnie wyższe niż u pacjentek z T1DM ($p < 0,000001$). Średnie stężenie 1,5-AG u kobiet bez cukrzycy obniżało się w miarę rozwoju ciąży a jego średnia wartość wynosiła 14 $\mu\text{g/ml}$ w I, 11,9 $\mu\text{g/ml}$ w II i 11,3 $\mu\text{g/ml}$ w III trymestrze.

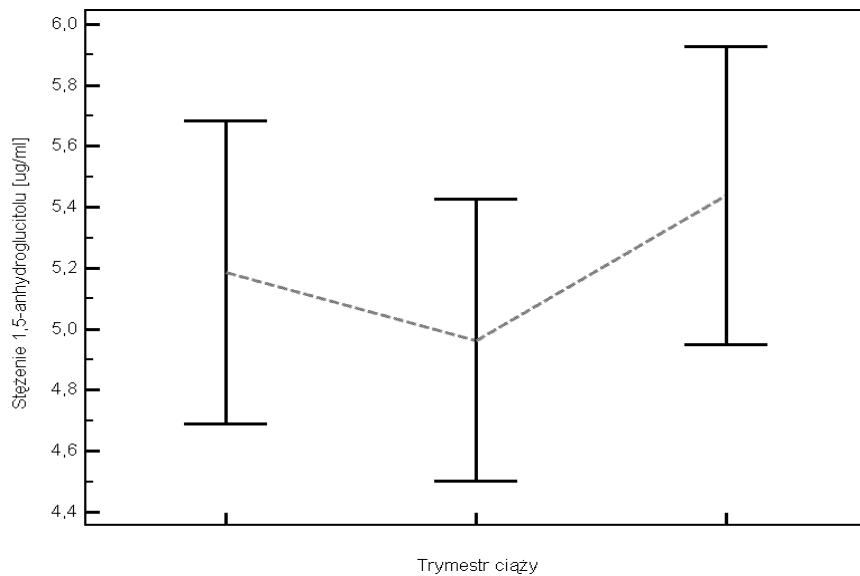
W Tabeli 6 przedstawiono kontrolę glikemii w badanej grupie kobiet z T1DM w czasie ciąży. Nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu 1,5-AG w surowicy w poszczególnych trymestrach ciąży w badanej grupie kobiet z T1DM. Średni poziom 1,5-AG wynosił odpowiednio $5,2 \pm 2,34 \mu\text{g/ml}$ w I trymestrze, $5 \pm 2,2 \mu\text{g/ml}$ w II trymestrze oraz $5,4 \pm 2,3 \mu\text{g/ml}$ w III trymestrze ciąży ($p=0,43$) [Rycina 4]. Podobnie, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy I, II i III trymestrem ciąży w zakresie średniej glikemii ($109,9 \pm 24,9 \text{ mg/dl}$ vs. $106,2 \pm 15,8 \text{ mg/dl}$ vs. $105,5 \pm 14,5 \text{ mg/dl}$; $p=0,82$) i średniej maksymalnej glikemii ($172,1 \pm 41,2 \text{ mg/dl}$ vs. $164,5 \pm 34,1 \text{ mg/dl}$ vs. $160 \pm 33,2 \text{ mg/dl}$; $p=0,13$). Stwierdzono istotne statystycznie obniżenie wartości stężenia HbA_{1c} w II i III trymestrze ciąży w porównaniu z wartością tego wskaźnika w I trymestrze ($p=0,001$) (Tabela 6).

Tabela 6. Wartości wskaźników glikemii u ciężarnych z T1DM w poszczególnych trymestrach ciąży.

	1,5-AG [ug/ml]	HbA1c [%]	Średnia glikemia [mg/dl]	Średnia maksymalna glikemia [mg/dl]
I trymestr				
Średnia±SD	5,16 ± 2,34	5,97 ± 0,92	109,9 ± 24,9	172,1 ± 41,2
Mediana	4,2	5,9	105,3	169
Min-Max	2,95-13,2	4,4-9,2	71,7-293,8	102-310
II trymestr				
Średnia±SD	4,96 ± 2,17	5,45 ± 0,64	106,21 ± 15,8	164,5 ± 34,1
Mediana	4,04	5,4	103	160
Min-Max	2,2-12,2	4,3-6,9	83-143,6	110,3-242,7
III trymestr				
Średnia±SD	5,39 ± 2,3	5,48 ± 0,68	105,5 ± 14,47	160 ± 33,24
Mediana	4,54	5,5	105	154
Min-Max	2,8-15,1	3,9-8,0	72,6-150	108-260

W tabeli przedstawiono średnią glikemię i średnią maksymalną glikemię w SMBG.

Rycina 4. Średnie stężenie 1,5-AG w poszczególnych trymestrach ciąży u kobiet z T1DM.



ANOVA: df= 2; F-ratio= 0,85; p= 0,43

Zaobserwowano również, że średnie stężenie 1,5-AG w surowicy ciężarnych chorujących na cukrzycę z $HbA_{1c} > 6,1\%$ było istotnie niższe niż u ciężarnych uzyskujących to kryterium wyrównania metabolicznego ($4,5 \pm 1,9 \mu\text{g/ml}$ vs. $5,4 \pm 2,5 \mu\text{g/ml}$; $p=0,02$).

4.2. Analiza korelacji 1,5-AG oraz HbA_{1c} ze wskaźnikami uzyskanymi na podstawie SMBG i CGMS

4.2.1. Ocena zależności pomiędzy 1,5-AG i HbA_{1c} a parametrami SMBG

Tabela 7. Korelacja pomiędzy poziomem 1,5-AG oraz HbA_{1c} a parametrami SMBG.

	Średnia glikemia[mg/dl]	Średnia maksymalna glikemia [mg/dl]	Odchylenie standardowe glikemii [mg/dl]
I trymestr			
1,5-AG	-0,51 (0,000001)	-0,72 (0,000001)	-0,63 (0,000001)
HbA _{1c}	0,61 (0,000001)	0,43 (0,0002)	0,43 (0,003)
II trymestr			
1,5-AG	-0,47 (0,00001)	-0,63 (0,000001)	-0,43 (0,00002)
HbA _{1c}	0,43 (0,0001)	0,23 (0,044)	NS
III trymestr			
1,5-AG	-0,41 (0,00002)	-0,65 (0,000001)	-0,63 (0,000001)
HbA _{1c}	0,34 (0,0013)	0,2 (0,05)	NS
łącznie			
1,5-AG	-0,45 (0,000001)	-0,77 (0,000001)	-0,6 (0,000001)
HbA _{1c}	0,46 (0,000001)	0,3 (0,0001)	0,18 (0,01)

W tabeli wyniki przedstawiono jako r (współczynnik korelacji), w nawiasie podano poziom istotności.

Stężenie 1,5-AG korelowało istotnie z indeksami glikemii w SMBG podczas całego okresu ciąży. Korelacja ta wynosiła – dla średniego stężenia glukozy $r=-0,45$; $p=0,000001$, dla średniej maksymalnej glikemii $r=-0,77$; $p=0,000001$ oraz dla odchylenia standardowego glikemii $r=-0,6$; $p=0,000001$.

Dodatkowo zależność pomiędzy stężeniem 1,5-AG w badanej grupie ciężarnych z T1DM oraz parametrami SMBG analizowano odrębnie dla każdego z trymestrów ciąży. Wielkość współczynników korelacji pomiędzy 1,5-AG oraz HbA_{1c} a średnią glikemią, średnią maksymalną glikemią oraz odchyleniem standardowym glikemii przedstawiono w Tabeli 7. Zaobserwowano znamiennej statystycznie, ujemną korelację pomiędzy 1,5-AG a średnim stężeniem glukozy w I ($r=-0,51$; $p<0,000001$), II ($r=-0,47$; $p<0,000001$) i III ($r=-0,41$; $p=0,000002$) trymestrze ciąży. Stwierdzono silną, ujemną korelację pomiędzy 1,5-AG a zmiennymi charakteryzującymi maksymalną wartość glikemii – średnim maksymalnym stężeniem glukozy oraz średnim odchyleniem standardowym glikemii. Wartość współczynnika korelacji 1,5-AG z maksymalną glikemią wynosiła $r=-0,72$; $p<0,000001$ w I trymestrze oraz $r=-0,63$; $p<0,000001$ w II i $r=-0,65$; $p<0,000001$ w III trymestrze ciąży. Korelacja z odchyleniem standardowym glikemii wyniosła $r=-0,63$; $p<0,000001$ w I, $r=-0,43$; $p=0,000017$ w II oraz $r=-0,63$; $p<0,000001$ w III trymestrze ciąży. Nie stwierdzono istotnych różnic we współczynnikach korelacji 1,5-AG z maksymalną i średnią glikemią pomiędzy poszczególnymi trymestrami ciąży.

W kolejnym etapie oceniono różnice we współczynnikach korelacji 1,5-AG z glikemią w SMBG i HbA_{1c} z glikemią w SMBG. Stwierdzono statystycznie silniejszą korelację pomiędzy stężeniem 1,5-AG i maksymalną glikemią niż korelacja HbA_{1c} z maksymalną glikemią w SMBG ($p<0,0001$) dla wszystkich trymestrów ciąży łącznie, a także w odrębnej analizie dla I-go ($p=0,006$), II-go ($p=0,001$) i III-go ($p=0,0002$) trymestru ciąży. Nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy we współczynnikach korelacji 1,5-AG oraz HbA_{1c} ze średnim stężeniem glukozy w SMBG ($p=0,56$).

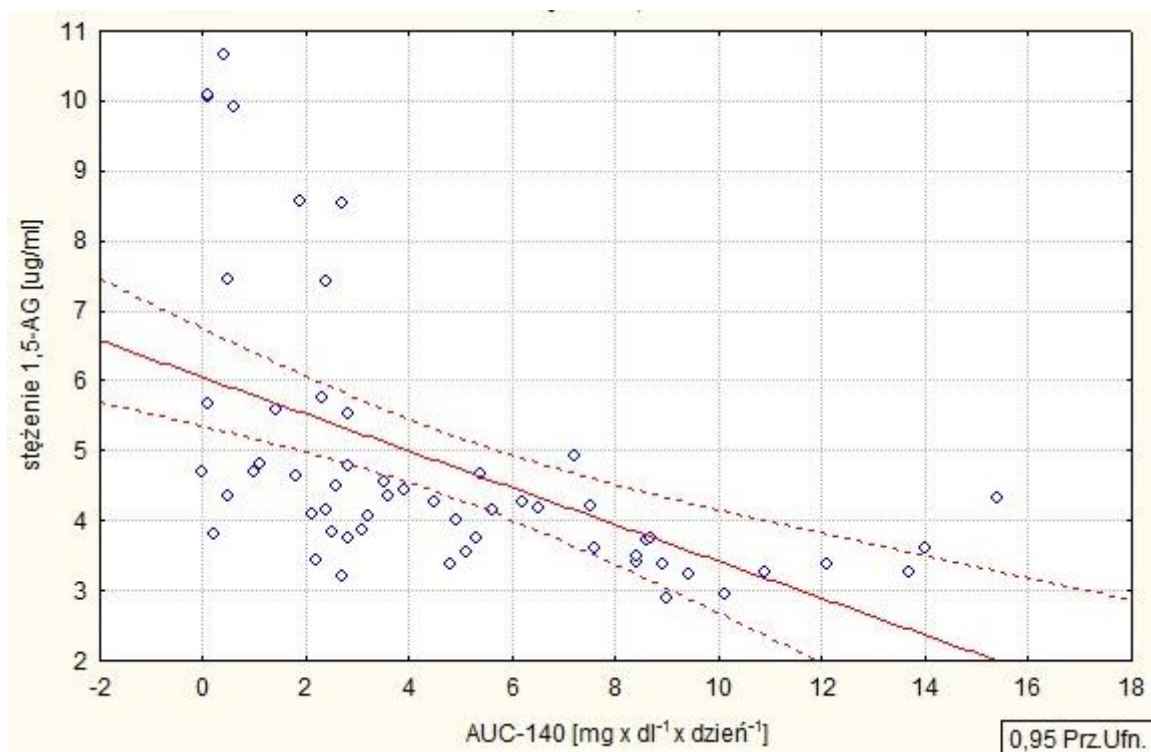
4.2.2. Ocena zależności pomiędzy poziomem 1,5-AG oraz HbA_{1c} a parametrami CGMS

Do oceny korelacji pomiędzy 1,5-AG a parametrami glikemii wykorzystano zapis CGMS przeprowadzony u 58 ciężarnych z T1DM. W tej podgrupie w czasie zapisu 10 kobiet było w I, 28 w II a 20 kobiet w III trymestrze ciąży. Wartości współczynników glikemii ocenianych na podstawie pomiaru CGMS w opisywanej grupie pacjentek z T1DM wynosiły: średnia glikemia – $104,5 \pm 14,9$ mg/dl, średnia maksymalna glikemia – $177,7 \pm 28,6$ mg/dl, odchylenie standardowe glikemii – $35 \pm 9,2$ mg/dl, pole pod krzywą glikemii równej 140 mg/dl (AUC-140) – $4,7 \pm 3,9$ mg/dl⁻¹/dzień⁻¹, pole pod krzywą glikemii 56 mg/dl – $2,5 \pm 7,9$ mg/dl⁻¹/dzień⁻¹. Wartości średniej i maksymalnej glikemii uzyskane na podstawie pomiarów dokonywanych glukometrem w badanej grupie pacjentek wynosiły $109,9 \pm 13,9$ mg/dl oraz $171,27 \pm 28,3$ mg/dl. W tej podgrupie pacjentek z T1DM średnie stężenie 1,5-AG wynosiło $4,81 \pm 1,92$ µg/ml, średni poziom HbA_{1c} wynosił $5,42 \pm 0,62$ %.

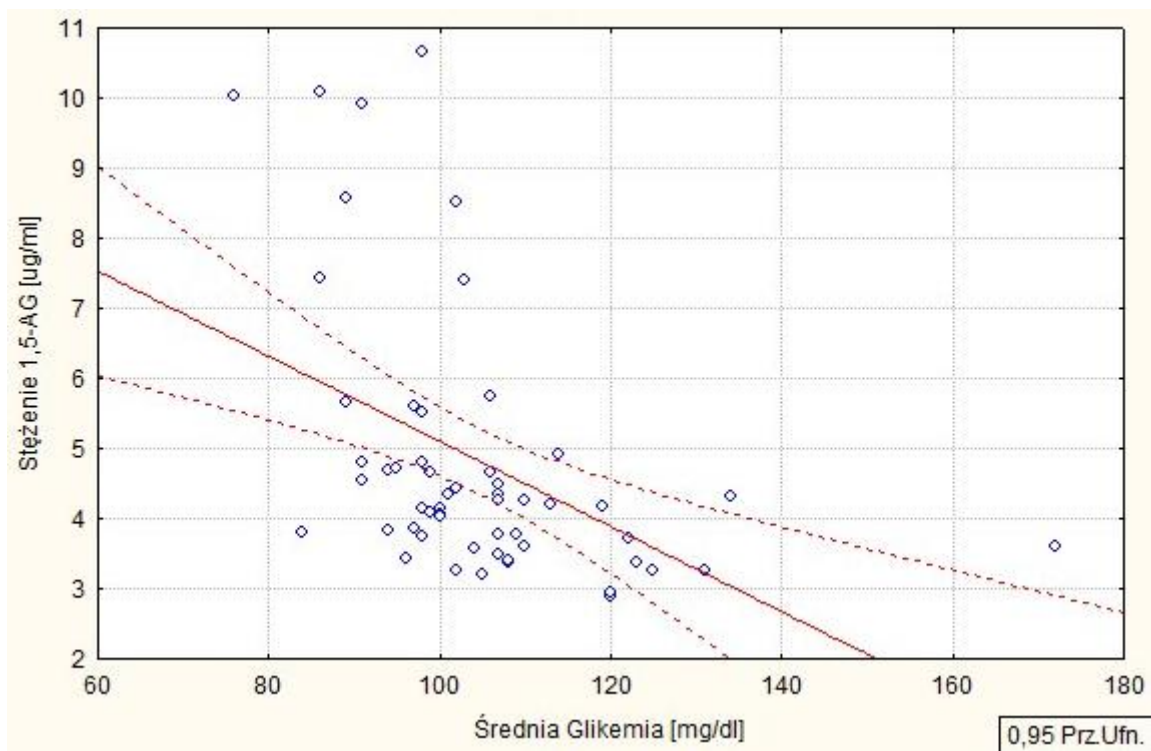
Odnotowano istotną statystycznie, ujemną korelację pomiędzy stężeniem 1,5-AG a indeksami glikemii w zapisie CGMS - średnim maksymalnym stężeniem glukozy ($r=-0,58$; $p=0,000004$), odchyleniem standardowym glikemii ($r=-0,6$; $p=0,00002$), AUC-140 mg/dl ($r=-0,65$; $p<0,000001$) oraz średnim stężeniem glukozy ($r=-0,54$; $p=0,00003$).

Porównanie korelacji pomiędzy 1,5-AG i HbA_{1c} a parametrami CGMS zestawiono w Tabeli 8. W analizowanej grupie stężenie HbA_{1c} korelowało istotnie ze średnią glikemią ($r=0,33$; $p=0,014$). Nie odnotowano istotnej zależności pomiędzy stężeniem HbA_{1c} oraz parametrami charakteryzującymi maksymalną glikemię. Zaobserwowano natomiast istotną ujemną korelację tego markera z wartością AUC-56 mg/dl w ciągu 24 godzin poprzedzających pomiar ($r=-0,41$; $p=0,008$).

Rycina 5. Korelacja pomiędzy stężeniem 1,5-AG a polem nad krzywą glikemii 140 mg/dl uzyskanym na podstawie zapisu CGMS.



Rycina 6. Korelacja pomiędzy stężeniem 1,5-AG a średnią glikemią na podstawie zapisu CGMS.



Rycina 7. Korelacja pomiędzy stężeniem 1,5-AG a średnim maksymalnym stężeniem glukozy na podstawie zapisu CGMS.

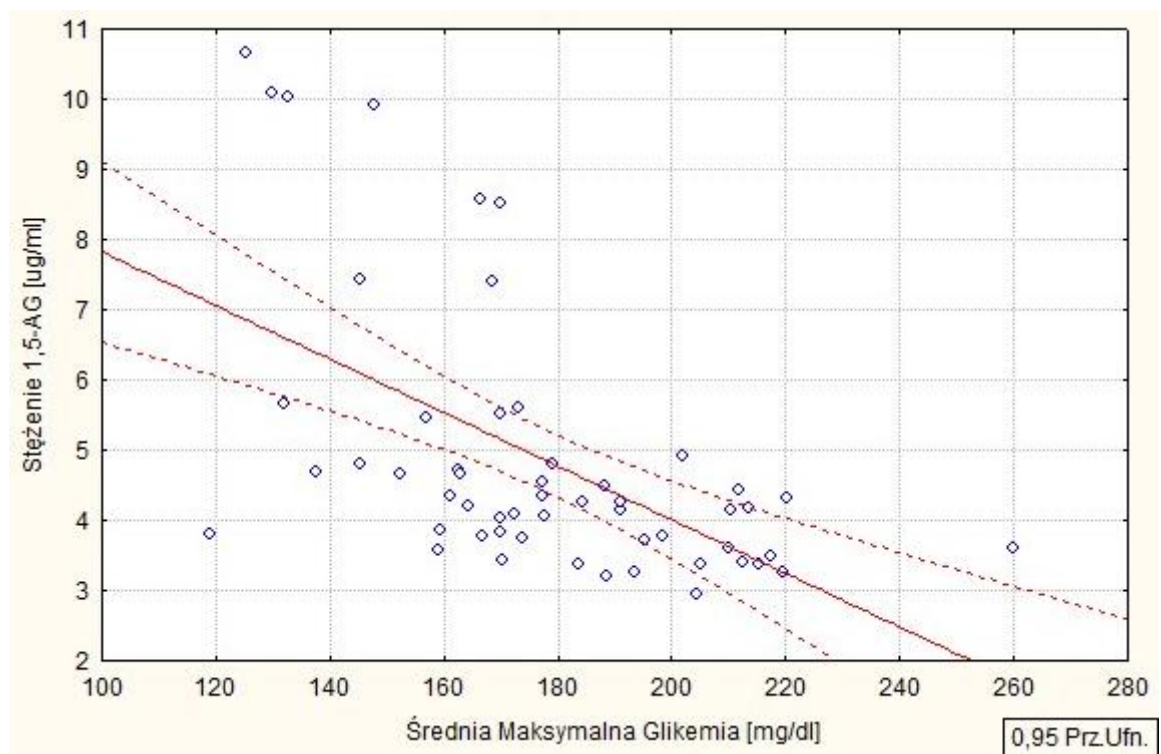


Tabela 8. Korelacja pomiędzy 1,5-AG oraz HbA1c a indeksami glikemii w zapisie CGMS.

	1,5-AG [$\mu\text{g/ml}$]	HBA _{1c} [%]
AUC-140 [mgxdlxdzień^{-1}]		
R	-0,65	0,22
P	<0,000001	0,1
AUC-56 [mgxdlxdzień^{-1}]		
R	0,05	-0,23
P	0,79	0,09
MMBG* [mg/dl]		
R	-0,58	0,2
p	0,000004	0,15
SD [mg/dl]		
R	-0,6	0,18
p	0,00002	0,22
MBG** [mg/dl]		
R	-0,54	0,33
p	0,000031	0,014
AUC-140 [mgxdlxdzień^{-1}] [#]		
R	-0,53	0,1
p	0,0003	0,5
AUC-56 [mgxdlxdzień^{-1}] [#]		
R	0,22	-0,41
p	0,16	0,008

W tabeli przedstawiono **średnią glikemię oraz *średnią maksymalną glikemię w zapisie CGMS.
[#] dane dotyczące okresu 1 dnia poprzedzającego pobranie krwi do oznaczeń laboratoryjnych.

4.2.3. Analiza wieloczynnikowa związku 1,5-AG, HbA_{1c} i glikemii w SMBG z AUC-140 w zapisie CGMS

W dodatkowej analizie metodą regresji liniowej przeprowadzono ocenę zależności z AUC-140 w modelu wieloczynnikowym uwzględniając następujące zmienne - stężenie 1,5-AG, stężenie HbA_{1c}, średnia glikemia i średnia maksymalna glikemia w profilu dobowym. Opisany model dodatkowo wystandaryzowano względem tygodnia ciąży, w którym pobierano krew do analiz laboratoryjnych. W tak scharakteryzowanym modelu ($R=0,8$; $R^2=0,6$; $p<0,000001$) stężenie 1,5-AG stanowiło najsilniejszy predyktor 140-AUC ($\beta=-0,61$; $p<0,000001$) w porównaniu do pozostałych, standardowych metod monitorowania (Tabela 9). Związek z AUC-140 dla stężenia HbA_{1c} wynosił $\beta=0,2$; $p=0,04$. Maksymalna glikemia w profilu dobowym była predyktorem zależnym od 1,5-AG.

Tabela 9. Wyniki regresji wieloczynnikowej dla AUC-140 w CGMS.

AUC-140	MBG [mg/dl]	MMBG [mg/dl]	Tydzień ciąży	HbA_{1c} [%]	1,5-AG [µg/ml]
β	-0,08	0,19	-0,22	0,2	-0,61
95% CI	-0,33-0,16	-0,04-0,33	-0,42—0,02	0,01-0,4	-0,83- -0,38
p	0,5	0,09	0,03	0,04	<0,000001
95% CI	-0,01-0,01	-0,001-0,01	-0,03- -0,01	0,01-0,34	-0,23- -0,11

$R=0,8$, $R^2=0,6$; $p<0,000001$

4.3. Ocena 1,5-AG jako markera hiperglikemii poposiłkowej.

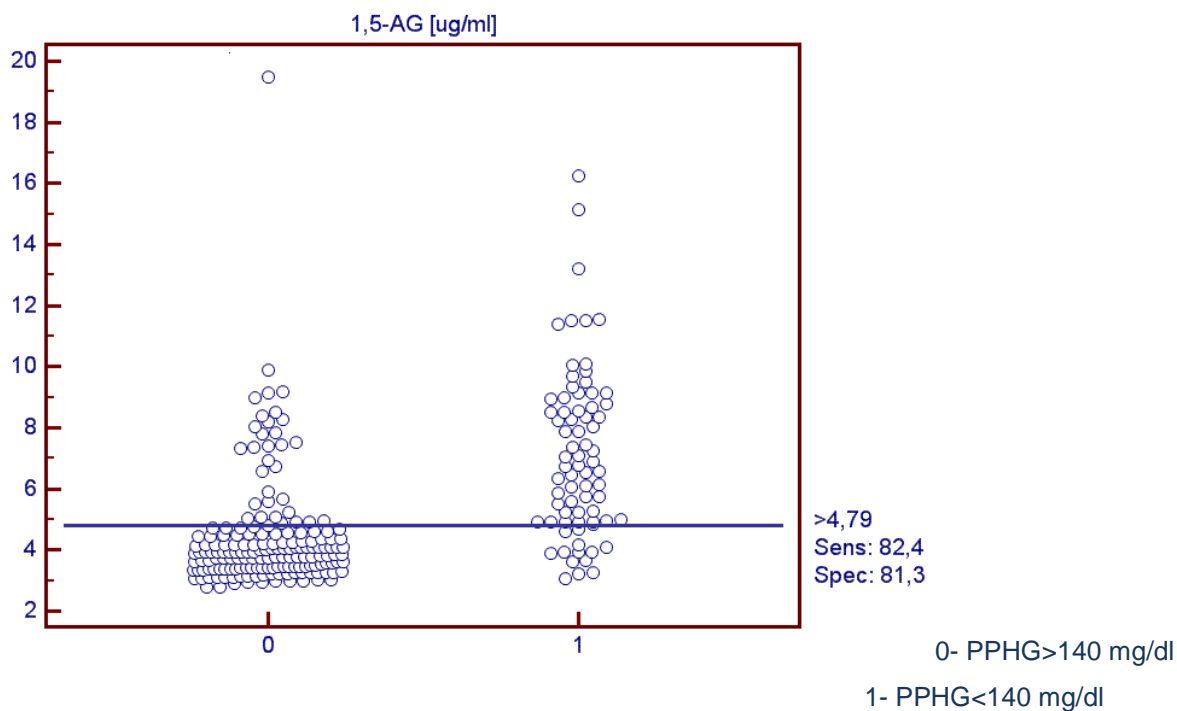
4.3.1. Ocena 1,5-AG jako markera PPHG w SMBG przy użyciu metody ROC

Ocenę stężenia 1,5-AG jako markera hiperglikemii uzyskanej na podstawie dobowego profilu glikemii przeprowadzono przy użyciu analizy ROC. Hiperglikemię poposiłkową zdefiniowano jako średnią wartość maksymalnej glikemii w ciągu jednego tygodnia przed pomiarem przekraczającą 140 mg/dl (tj. kryterium glikemii poposiłkowej u ciężarnych wg. PTD do roku 2008 oraz średnia wartość progu nerkowego dla glukozy u ciężarnych) lub 120 mg/dl (tj. kryterium glikemii poposiłkowej u ciężarnych z cukrzycą według zaleceń PTD na rok 2012).

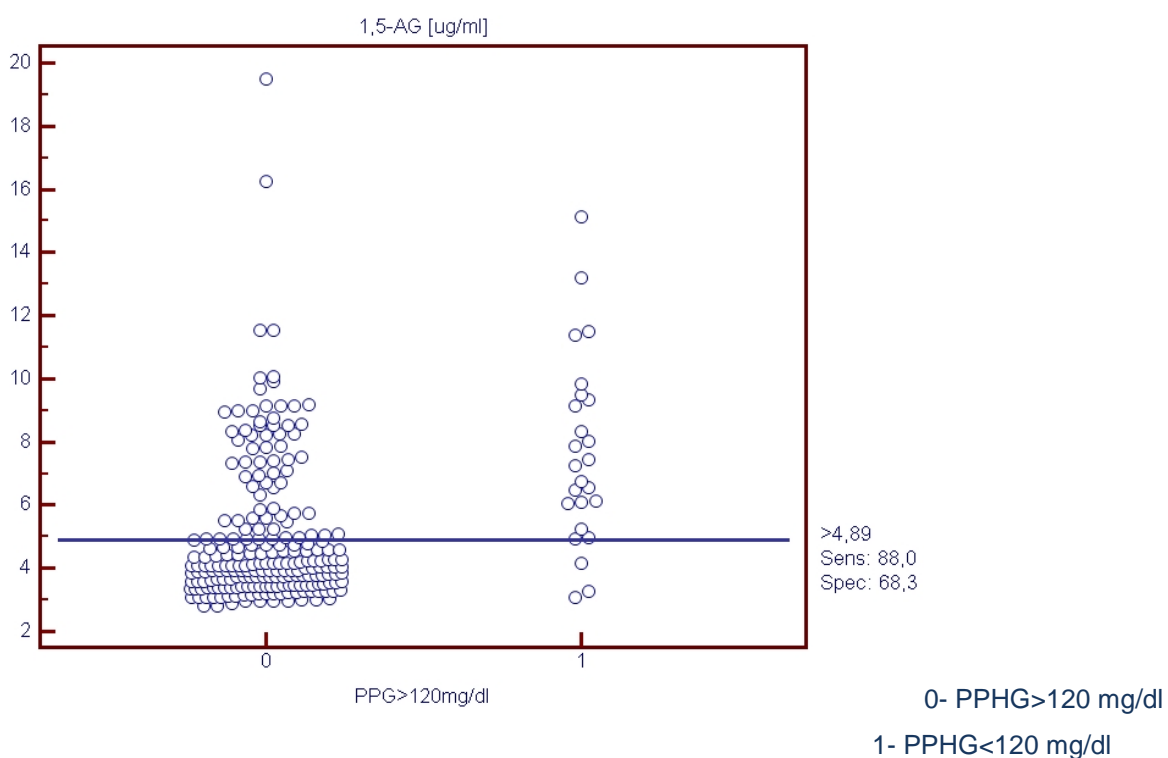
U wszystkich pacjentek z T1DM poziom glikemii w profilu dobowym, w badanym okresie był co najmniej 1 raz wyższy niż 120 mg/dl i 140 mg/dl. Kryterium średniej glikemii poposiłkowej równej lub mniejszej niż 140 mg/dl spełniało 35% kobiet, zaś kryterium 120 mg/dl spełniało jedynie 16% badanych. Stężenie 1,5-AG było niższe u ciężarnych z hiperglikemią wyższą niż 140 mg/dl ($5,1 \pm 9,2 \mu\text{g/ml}$ vs. $7,3 \pm 2,8 \mu\text{g/ml}$; $p < 0,000001$) oraz 120 mg/dl ($4,92 \pm 2,07 \mu\text{g/ml}$ vs. $7,67 \pm 2,98 \mu\text{g/ml}$; $p = 0,000002$) w porównaniu do pozostałych kobiet.

Wyznaczone na podstawie krzywej ROC stężenie 1,5-AG rozróżniało ciężarne pacjentki z istniejącą hiperglikemią powyżej 140 mg/dl i 120 mg/dl od ciężarnych z dobrą kontrolą glikemii poposiłkowej. Pole pod krzywą ROC dla hiperglikemii poposiłkowej 140 mg/dl jako funkcji stężenia 1,5-AG wynosiło 0,84 (95% CI: 0,78-0,89; $p < 0,0001$) dla kryterium stężenia 1,5-AG równego $4,79 \mu\text{g/ml}$. Czulość wynosiła 82,4% (95%CI: 71,8-90,3), swoistość - 81,3% (95% CI: 74,6-86,8), PPV - 70,35%, NPV - 89,56%. Pole pod krzywą ROC dla przyjętego kryterium hiperglikemii poposiłkowej 120 mg/dl jako funkcji stężenia 1,5-AG wynosiło 0,8 (95% CI: 0,74-0,84; $p < 0,0001$) dla punktu odcięcia stężenia 1,5-AG równego $4,89 \mu\text{g/ml}$. Czulość wynosiła 88% (95% CI: 68,8-97,6), swoistość - 68,3% (95% CI: 61,8-74,9). Wartość predykcyjna dodatnia (PPV, *Positive Predictive Value*) wynosiła 35%, wartość predykcyjna ujemna (NPV, *Negative Predictive Value*) - 96,8 %.

Rycina 8. Stężenie 1,5-AG w podgrupach ciężarnych z T1DM zdefiniowanych na podstawie kryterium hiperglikemii 140 mg/dl dla punktu odcięcia równego 4,79 $\mu\text{g/ml}$.



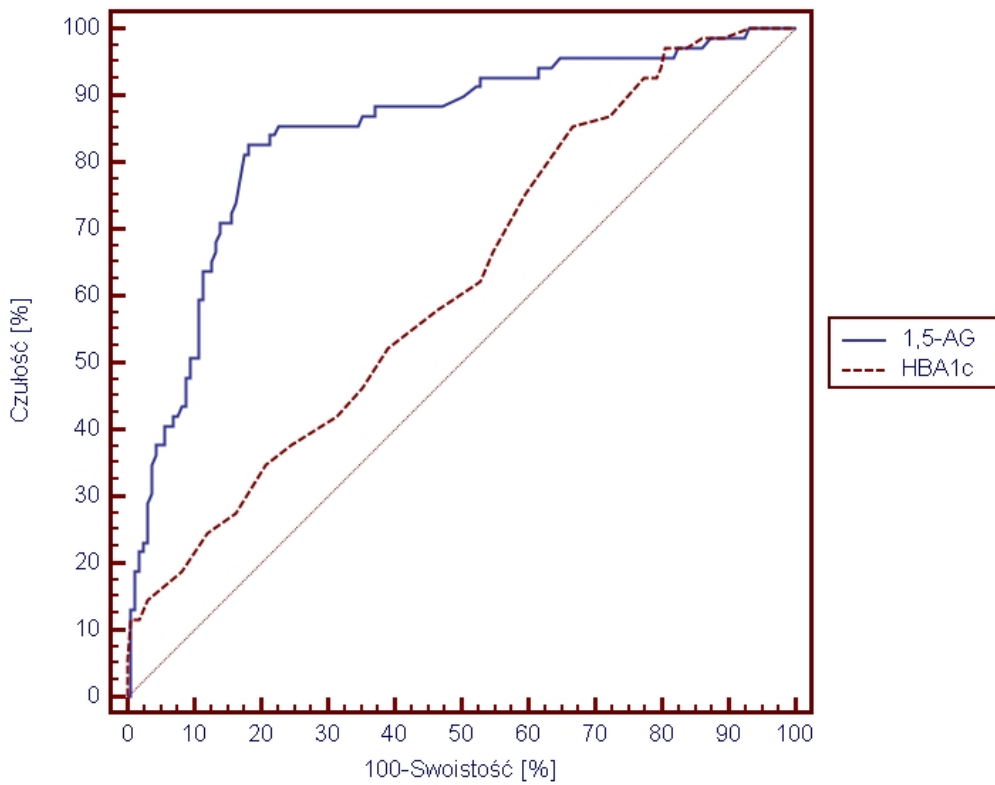
Rycina 9. Stężenie 1,5-AG w podgrupach ciężarnych z T1DM zdefiniowanych na podstawie kryterium hiperglikemii 120 mg/dl dla punktu odcięcia równego 4,89 $\mu\text{g/ml}$.



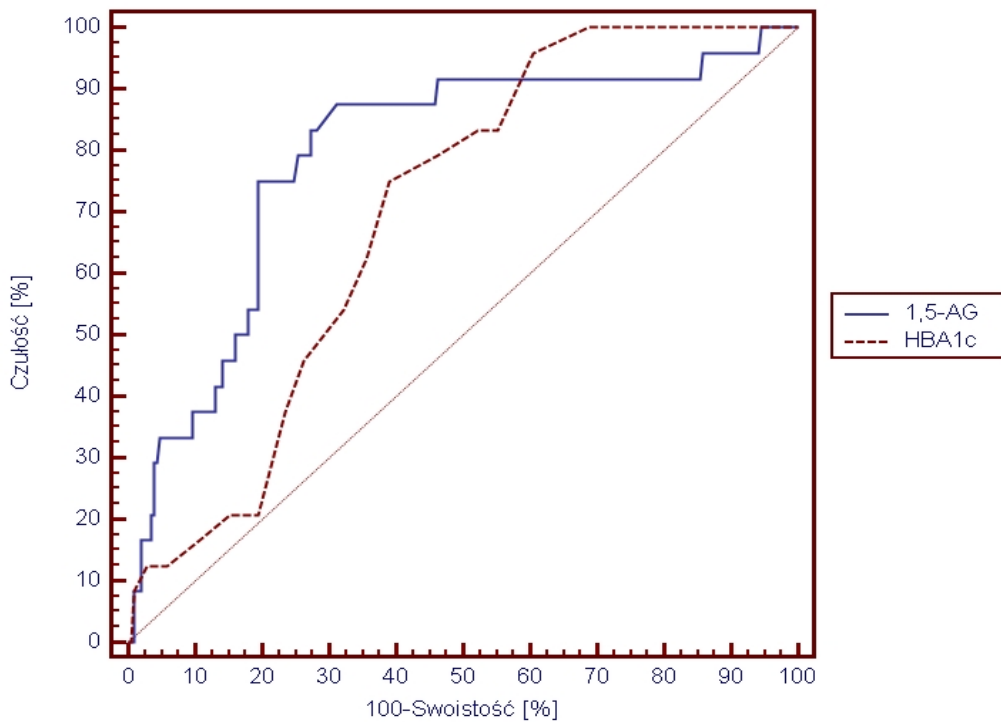
4.3.2. Porównanie wartości klinicznej 1,5-AG i HbA_{1c} jako markerów PPHG w SMBG

W kolejnym etapie wartość diagnostyczną 1,5-AG jako markera hiperglikemii poposiłkowej porównano względem HbA_{1c}. W tym celu oceniono różnice w polach pod krzywymi ROC dla hiperglikemii jako funkcji obu markerów. Dla hiperglikemii powyżej 140 mg/dl AUC 1,5-AG było o 0,22 większe w porównaniu do AUC HbA_{1c} (95% CI: 0,13-0,32; $p < 0,0001$). Dla kryterium hiperglikemii 120 mg/dl AUC dla 1,5-AG było wyższe o 0,11 niż AUC HbA_{1c} (95% CI: -0,03-0,23; $p = 0,12$). Krzywe ROC 1,5-AG oraz HbA_{1c} zestawiono na Rycinie 10.

Rycina 10. Porównanie krzywych ROC dla 1,5-AG oraz HbA_{1c} jako markerów hiperglikemii a) powyżej 140 mg/dl i b) powyżej 120 mg/dl.



a) HbA_{1c}: AUC=0,62 [95%CI: 0,55-068], 1,5-AG: AUC=0,84 [95%CI: 0,79-0,89]



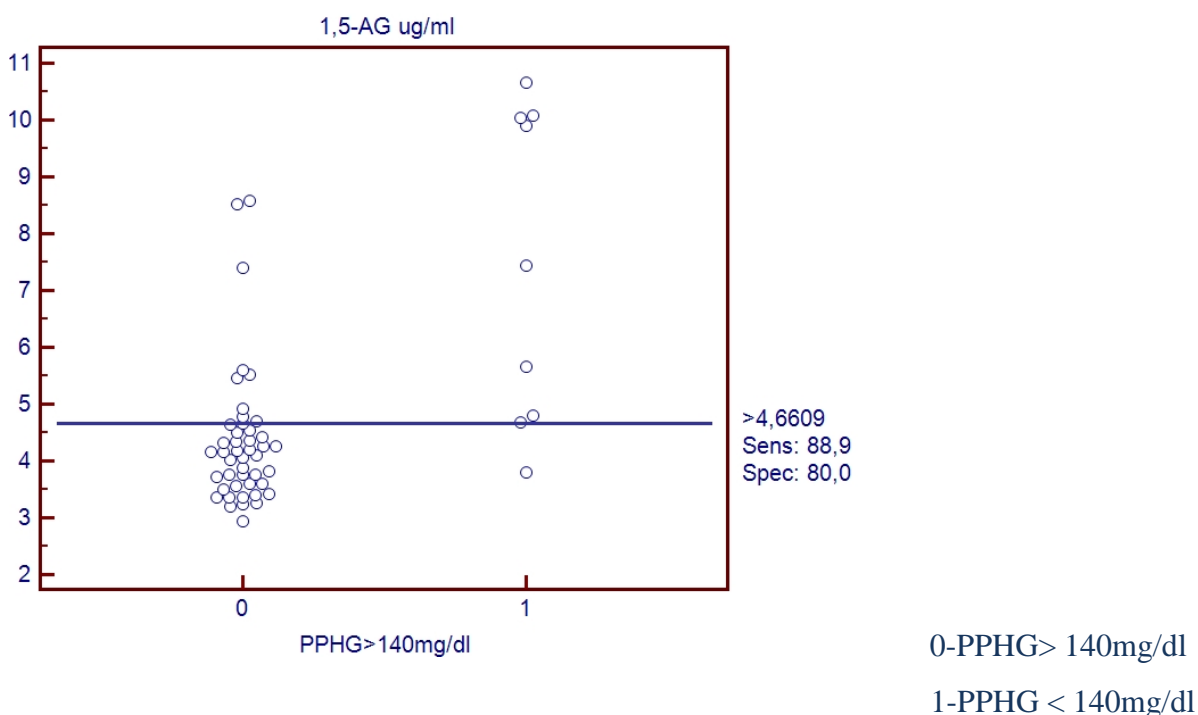
b) HbA_{1c}: AUC=0,69 [95%CI: 0,63-0,74], 1,5-AG: AUC=0,8 [95%CI: 0,74-0,84]

4.3.3. Ocena 1,5-AG jako markera PPHG na podstawie pomiaru CGMS.

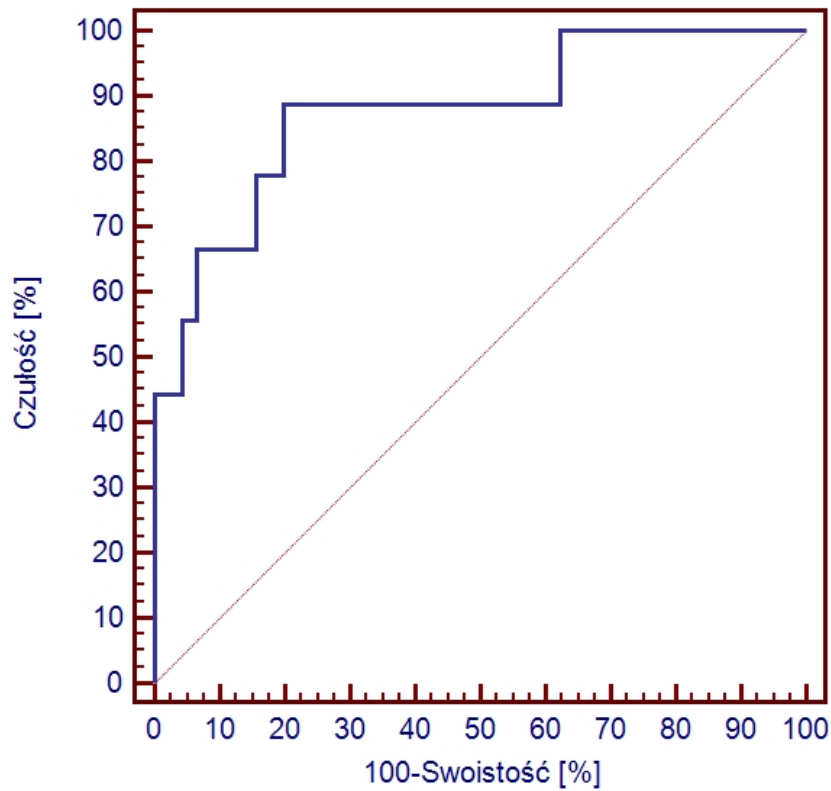
W kolejnym etapie wykonano analogiczną analizę ROC dla PPHG w zapisie CGMS.

Stwierdzono, że 9 badanych kobiet spełniało kryterium PPHG 140 mg/dl. Średnią wartość PPHG poniżej 120 mg/dl uzyskano jedynie u 2 osób z badanej grupy co uniemożliwiło przeprowadzenie oceny 1,5-AG jako kryterium wyrównania na tym poziomie glikemii. Uzyskane wyniki w odniesieniu do PPHG w CGMS były lepsze niż dla SMBG - Pole pod krzywą ROC dla hiperglikemii poposiłkowej 140 mg/dl jako funkcji stężenia 1,5-AG wynosiło 0,88 (95% CI: 0,76-0,86; $p < 0,0001$) dla kryterium stężenia 1,5-AG równego 4,66 $\mu\text{g/ml}$, przy wyższej wartości czułości - 88,9% (95%CI: 51,8-99,7-90,3). Swoistość wynosiła 80% (95%CI: 65,4 – 90,4). Porównując AUC 1,5-AG dla PPHG > 140 mg/dl z AUC dla HbA_{1c} dla PPHG > 140 mg/dl stwierdzono, że AUC 1,5-AG było o 0,25 większe w porównaniu do AUC HbA_{1c} (95% CI: 0,03-0,47; $p < 0,0001$). Porównanie krzywych ROC dla 1,5-AG oraz HbA_{1c} jako markerów hiperglikemii powyżej 140mg/dl na podstawie CGMS przedstawia Rycina 13.

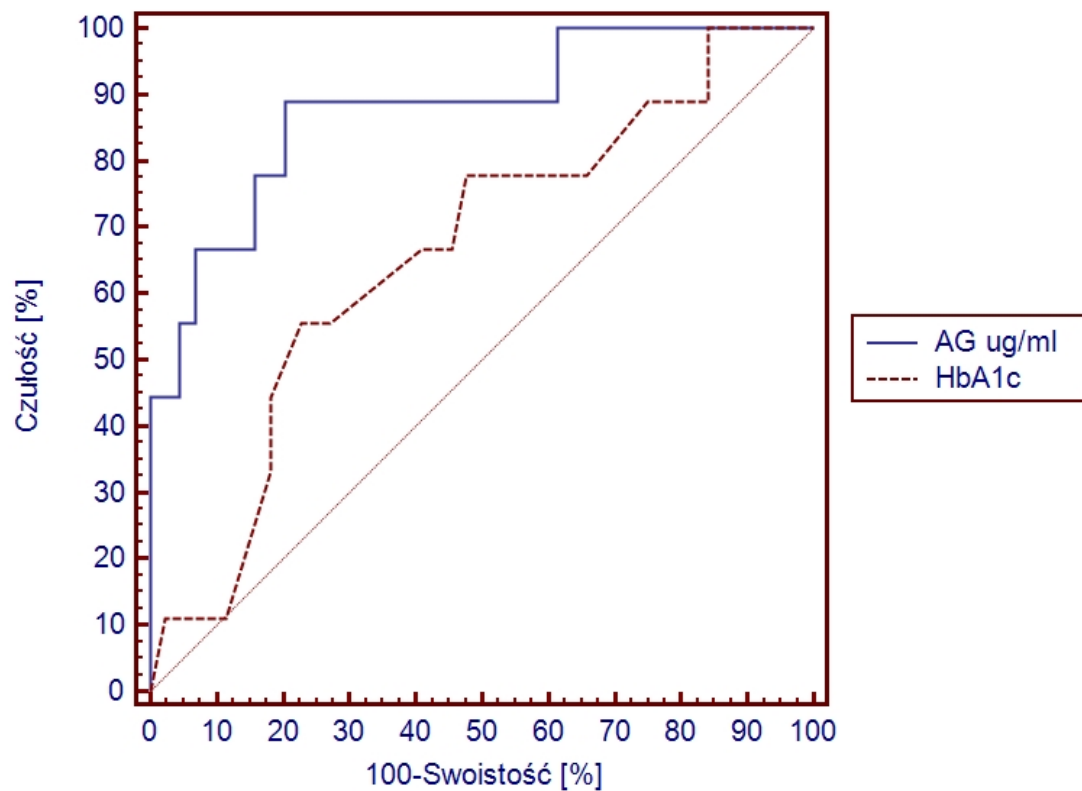
Rycina 11. Stężenie 1,5-AG w podgrupach ciężarnych z T1DM zdefiniowanych na podstawie kryterium hiperglikemii 140 mg/dl.



Rycina 12. Krzywa ROC dla 1,5-AG jako markera PPHG powyżej 140mg/dl w CGMS.



Rycina 13. Porównanie krzywych ROC 1,5-AG i HbA_{1c} jako markerów glikemii powyżej 140 mg/dl uzyskanej w CGMS.



4.4. Ocena zależności pomiędzy stężeniem 1,5-AG u matki a masą urodzeniową noworodka

4.4.1. Charakterystyka kliniczna badanej grupy

Związek pomiędzy stężeniem 1,5-AG a masą urodzeniową noworodka oceniono u 81 pacjentek z T1DM. Średni wiek badanej grupy wynosił $29,8 \pm 4,6$ lat, średni czas trwania cukrzycy $12,3 \pm 7,5$ lat, średnie BMI przed ciążą $23,8 \pm 4,4$ kg/m². Średnie stężenie 1,5-AG w II trymestrze ciąży wynosiło $4,8 \pm 1,99$ µg/ml, w III trymestrze zaś $4,9 \pm 1,8$ µg/ml. Średnie stężenie HbA_{1c} wynosiło $5,46 \pm 0,7$ % w II i $5,41 \pm 0,7$ % w III trymestrze. Zaobserwowano, że 73 kobiety (92% badanej grupy ciężarnych) miały prawidłowy poziom HbA_{1c} (<6,1%). Średnia urodzeniowa masa ciała noworodków wynosiła $3503,6 \pm 654$ g. Średni termin porodu przypadł w $40,9 \pm 4,1$ tygodniu ciąży. U 27 (33%) noworodków wystąpiła LGA, zaś u 21 (27%) stwierdzono makrosomię. Średnie stężenie 1,5-AG w II oraz w III trymestrze ciąży różniło się istotnie pomiędzy grupami z LGA i prawidłową masą urodzeniową (Rycina 14). Wyrównanie glikemii w zależności od masy urodzeniowej noworodków zestawiono w Tabeli 10.

Rycina 14. Średnie stężenie 1,5-AG u ciężarnych w a) II oraz b) III trymestrze ciąży w grupach z LGA oraz prawidłową masą urodzeniową noworodka.

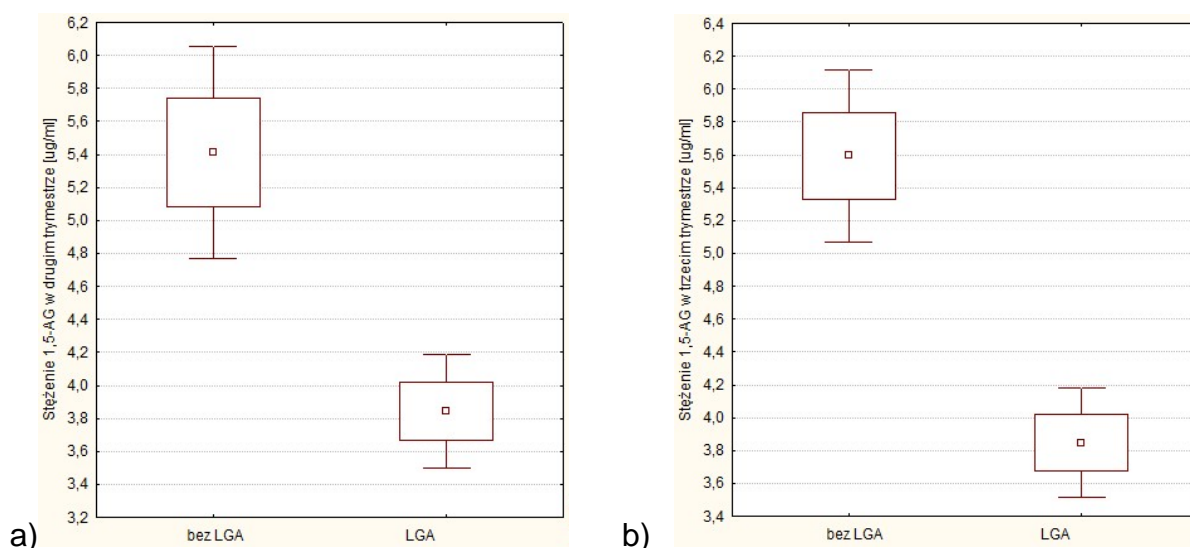


Tabela 10. Charakterystyka kliniczna pacjentek z T1DM w zależności od masy urodzeniowej noworodka.

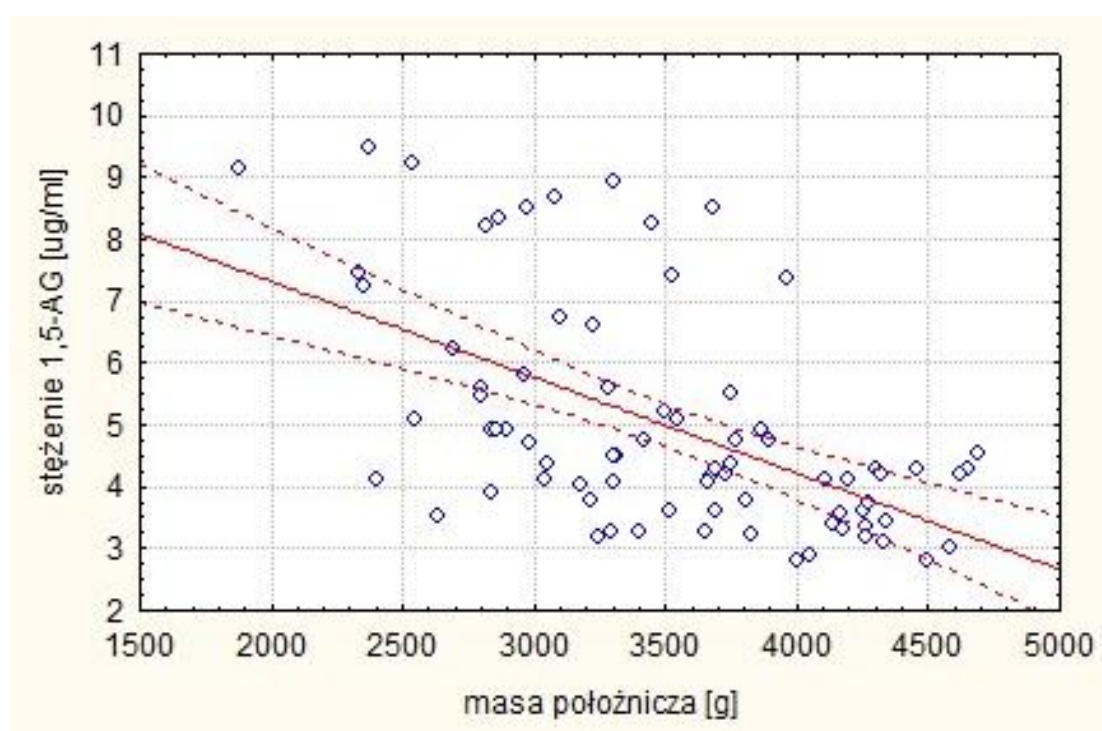
Cecha	Masa urodzeniowa		p
	< 90 centyla (N=54)	≥ 90 centyla (N=27)	
MBG [mg/dl]			
II	101,2; 10,5	114,4; 17,5	0,0002
III	102,3; 13,1	110,4; 14,9	0,024
MMBG [mg/dl]			
II	153,4; 33,5	177,9; 25,6	0,001
III	156,4; 35,8	168,9; 37,1	0,02
HbA _{1c} [%]			
II	5,26; 0,65	5,8; 0,66	0,001
III	5,23; 0,6	5,79; 0,72	0,003
1,5-AG [μg/ml]			
II	5,39; 2,2	3,85; 0,94	0,001
III	5,58; 1,88	3,84; 0,92	0,00001
Wiek [lata]	29,48; 4,6	30; 4,4	0,62
BMI [kg/m ²]	23,72; 4,6	24,04; 3,7	0,75
Masa urodzeniowa [g]	3148,9; 463,5	4205; 280,8	0,000001
Masa urodzeniowa [centyl]	46,5; 25,1	97,2; 2,5	0,000001
APGAR [n] [10/9/8/7-6/5-3]	47/3/3/0/1	20/5/0/0/1	Nie dotyczy

W tabeli dane dotyczące punktacji w skali Apgar przedstawiono jako ilość noworodków. Dla pozostałych danych przedstawiono średnią i odchylenie standardowe.

4.4.2. Analiza korelacji pomiędzy 1,5-AG oraz innymi wskaźnikami wyrównania metabolicznego a masą urodzeniową noworodka

Zaobserwowano znamiennej, ujemną korelację pomiędzy stężeniem 1,5-AG w II ($r=-0,44$; 95% CI: $-0,6—0,22$; $p<0,0001$) i III trymestrze ciąży ($r=-0,58$; 95% CI: $-0,71 - - 0,48$; $p<0,0001$) a masą urodzeniową noworodka.

Rycina 15. Korelacja pomiędzy stężeniem 1,5-AG u matki w III trymestrze ciąży a masą urodzeniową noworodka.



W analizie korelacji stwierdzono także dodatnią znamiennej zależność pomiędzy masą urodzeniową noworodka a stężeniem HbA_{1c} oraz średnim stężeniem glukozy i średnim maksymalnym stężeniem glukozy w profilu dobowym wykonanym za pomocą glukometru. Współczynniki korelacji pomiędzy masą urodzeniową noworodka oraz stężeniem poszczególnych markerów glikemii w II oraz w III trymestrze ciąży przedstawiono w Tabeli 11. Korelacja pomiędzy masą urodzeniową dziecka a tygodniem porodu wynosiła $r=0,25$ (95% CI: $0,03-0,44$; $p=0,028$).

Tabela 11. Korelacja poszczególnych wskaźników glikemii z masą urodzeniową noworodka.

Masa położnicza	1,5-AG [ug/ml]	HbA _{1c} [%]	Średnia glikemia [mg/dl]	Średnia maksymalna glikemia [mg/dl]
II trymestr				
r	-0,44	0,26	0,37	0,28
95%CI	-0,6- -0,22	0,04-0,46	0,17-0,57	0,1-0,48
P	0,0001	0,03	0,0009	0,019
n	75	75	71	71
III trymestr				
r	-0,58	0,29	0,29	0,37
95%CI	-0,71- -0,48	0,07-0,48	0,07-0,48	0,2-0,56
P	0,0001	0,01	0,01	0,001
n	80	78	79	78

W tabeli przedstawiono średnią glikemię i średnią maksymalną glikemię na podstawie SMBG.

4.4.3. Analiza związku stężenia 1,5-AG z masą urodzeniową noworodka

Celem oceny związku 1,5-AG z masą urodzeniową, skorygowanego względem pozostałych, standardowych predyktorów, kolejno utworzono modele wieloczynnikowe (GLM, *General Linear Model*).

W pierwszym modelu, stężenie 1,5-AG u matki w III trymestrze ciąży było istotnie związane z masą urodzeniową noworodka po standaryzacji względem potencjalnych predyktorów klinicznych: tygodnia porodu, BMI przed ciążą oraz wieku w momencie zajścia w ciążę ($\beta=-0,6$; $p<0,000001$) (Tabela 12).

Tabela 12. Wyniki regresji liniowej zmiennej zależnej masa urodzeniowa.

Masa urodzeniowa [g]	Wiek matki [lata]	BMI [kg/m ²]	Tydzień porodu	1,5-AG [μ g/ml]
β	0,25	-0,009	0,28	-0,6
95%CI	0,07-0,45	-	0,1-0,46	-0,78- -0,42
P	0,008	0,33	0,0027	<0,000001
95% CI	9,6-63,98	-	39,9-183,01	-281,7- -152,2

R=0,64; R²= 0,38 df=4; F=13,59; p=0,0000001

Po wprowadzeniu do modelu HbA_{1c} stężenie 1,5-AG ($\beta=-0,57$; $p<0,000001$), tydzień porodu ($\beta=0,26$; $p=0,005$) oraz wiek matki ($\beta=0,23$; $p=0,016$) pozostały znaczącymi predyktorami masy położniczej (Tabela 13). Natomiast stężenie HbA_{1c} nie było istotnym predyktorem masy urodzeniowej w modelu uwzględniającym stężenie 1,5-AG ($p=0,18$).

Tabela 13. Wyniki regresji liniowej zmiennej zależnej masa urodzeniowa.

Masa urodzeniowa	Wiek [lata]	BMI [kg/m ²]	Tydzień porodu	HbA1c [%]	1,5-AG [µg/ml]
β	0,23	-0,009	0,26	0,12	-0,57
95% CI	0,05-0,43	-	0,08-0,44	-	-0,75- -0,38
p	0,016	0,33	0,005	0,18	<0,000001
95% CI	6,5-61,6	-	32,3-177,5	-	-271,9- -136,9

R=0,67; R²=0,44; df=5; F=11,11; p=0,000001

W kolejnej analizie uwzględniono łączny wpływ standardowych wskaźników wyrównania metabolicznego (średnia oraz maksymalna glikemia w profilu dobowym wykonywanym za pomocą glukometru, stężenie HbA_{1c}) oraz poziom 1,5-AG, tydzień porodu, wiek, BMI (R²=0,45; R=0,67; p<0,000001). Również w tak zdefiniowanym modelu stężenie 1,5-AG pozostało najsilniejszym predyktorem masy urodzeniowej. Dodanie do modelu glikemii w SMBG nie wpłynęło na wartość współczynnika regresji dla 1,5-AG (β=-0,55; p<0,000001). Związek taki stwierdzono również dla wieku oraz tygodnia ciąży. Pozostałe zmienne - HbA_{1c} (p=0,25), średnia glikemia (p=0,95) oraz maksymalna glikemia (p=0,73), nie były niezależnymi predyktorami masy urodzeniowej noworodka.

Ponadto, w analizie regresji liniowej wykazano, że stężenie 1,5-AG w III trymestrze ciąży tłumaczyło 31% wariacji zmiennej zależnej (masa urodzeniowa) oraz 37% wariacji tej zmiennej po standaryzacji względem tygodnia porodu.

4.5. Ocena poziomu 1,5-AG jako predyktora noworodkowej LGA i makrosomii

4.5.1. Wyniki jednoczynnikowej regresji logistycznej

W analizie jednoczynnikowej regresji logistycznej stężenie 1,5-AG w II oraz III trymestrze ciąży było istotnym predyktorem noworodkowej LGA (OR= 0,46; 95% CI: 0,26-0,81; p=0,006 dla II trymestru i OR= 0,34; 95% CI: 0,17-0,65; p=0,0001 dla III trymestru) oraz makrosomii (OR=0,5; 95% CI: 0,3-0,94; p=0,03 dla II trymestru i OR=0,17; 95% CI: 0,06-0,47; p=0,0001 dla III trymestru).

Związek taki stwierdzono także dla pozostałych markerów wyrównania metabolicznego - stężenia HbA_{1c}, średniej glikemii w profilu dobowym i maksymalnej glikemii w profilu dobowym. Ilorazy szans (OR) dla wystąpienia LGA i makrosomii oraz zdolność dyskryminacyjną (AUC) tych parametrów przedstawiono w Tabeli 14.

Tabela 14. Wyniki jednoczynnikowej regresji logistycznej dla LGA oraz makrosomii.

LGA	1,5-AG [$\mu\text{g/ml}$]	HbA _{1c} [%]	Średnia glikemia [mg/dl]	Średnia maksymalna glikemia [mg/dl]
II trymestr				
OR	0,46	3,03	1,07	1,02
95%CI	0,26-0,81	1,4-6,5	1,03-1,1	1-1,03
P	0,006	0,005	0,001	0,05
AUC	0,76	0,71	0,72	0,63
III trymestr				
OR	0,34	3,6	1,04	1,01
95%CI	0,17-0,65	1,6-8,7	1,01-1,08	0,99-1,03
P	0,0001	0,003	0,02	0,09
AUC	0,81	0,71	0,65	0,66

makrosomia	1,5-AG [$\mu\text{g/ml}$]	HbA _{1c} [%]	Średnia glikemia [mg/dl]	Średnia maksymalna glikemia [mg/dl]
II trymestr				
OR	0,5	2,9	1,06	1,02
95%CI	0,3-0,94	1,4-6,7	1,02-1,1	1,01-1,04
P	0,03	0,01	0,004	0,04
AUC	0,7	0,7	0,7	0,69
III trymestr				
OR	0,17	3,3	1,05	1,02
95%CI	0,06-0,47	1,38-7,7	1,01-1,09	1,01-1,04
P	0,0001	0,007	0,02	0,04
AUC	0,84	0,7	0,66	0,69

4.5.2. Wyniki wieloczynnikowej regresji logistycznej

Wartości ilorazów szans oraz AUC dla utworzonych kolejno modeli wieloczynnikowych dla LGA i makrosomii przedstawiono w Tabelach 15 i 16. Ponieważ wartości 1,5-AG, HbA_{1c} i glikemii w II trymestrze nie wpływały istotnie na wyniki analizy, nie zostały umieszczone w ostatecznym modelu wieloczynnikowym.

Wzrost stężenia 1,5-AG o 1 µg/ml wiązał się z trzykrotnym zmniejszeniem ryzyka LGA oraz ponad pięciokrotnym spadkiem ryzyka makrosomii, niezależnie od ujęcia w modelu wieloczynnikowym. W modelu regresji logistycznej uwzględniającym następujące zmienne - stężenie 1,5-AG, wiek matki, BMI przed ciążą - stężenie 1,5-AG było niezależnym predyktorem LGA (OR=0,32; 95% CI: 0,16-0,63; p=0,0012) i makrosomii u (OR=0,17; 95% CI: 0,06-0,46; p=0,0006). Wiek matki oraz BMI nie były istotnie związane z wystąpieniem nieprawidłowej wagi u noworodka.

1,5-AG pozostał silnym predyktorem LGA (OR=0,34; 95% CI: 0,17-0,69, p=0,0027) i makrosomii (OR=0,18; 95% CI: 0,06-0,55; p=0,0025) także po standaryzacji opisanego modelu względem HbA_{1c}. Wystąpienie LGA przewidywało również stężenie HbA_{1c} (OR = 3,71, 95% CI: 1,26-11,0; p=0,02). W ramach wspólnego modelu dla makrosomii HbA_{1c} nie była istotnym niezależnym predyktorem (p=0,06). Uwzględnienie 1,5-AG w modelu wieloczynnikowym zwiększało jego siłę predykcyjną. Wartość pola pod krzywą ROC dla opisanego modelu dla LGA wynosiła 0,86 (95% CI: 0,76-0,92) w porównaniu do AUC równego 0,71 (95% CI: 0,59-0,81) w przypadku, gdy w model nie uwzględniał wpływu 1,5-AG. Wartość pola pod krzywą ROC dla opisanego modelu wieloczynnikowego dla makrosomii wynosiła 0,88 (95% CI: 0,78-0,94) w porównaniu do 0,68 (95% CI: 0,57-0,78) po wyłączeniu 1,5-AG.

W kolejnym modelu uwzględniono standardowe predyktory masy urodzeniowej dziecka wyodrębnione w analizie jednoczynnikowej - HbA_{1c}, glikemię w SMBG, stężenie 1,5-AG,

wiek i BMI. Niezależnymi predyktorami LGA i makrosomii w łącznym modelu były 1,5-AG oraz HbA_{1c}. AUC powyższego modelu wieloczynnikowego wynosiła 0,86 (95% CI: 0,76-0,93) dla LGA oraz 0,88 (95% CI: 0,79-0,94) dla makrosomii w porównaniu z 0,74 (95% CI: 0,63-0,83) oraz 0,76 (95% CI: 0,65-0,86) dla modelu uwzględniającego tradycyjne czynniki ryzyka.

Tabela 15. AUC oraz ilorazy szans wystąpienia LGA skorygowane względem BMI i wieku dla 1,5-AG, HbA_{1c} oraz wybranych parametrów glikemii w SMBG.

LGA	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5
1,5-AG					
OR	0,32		0,34		0,28
95%CI	0,16-0,64		0,17-0,69		0,11-0,64
HbA_{1c}					
OR		3,75	3,71	3,4	3,5
95%CI		1,57-8,9	1,26-11	1,35-8,72	1,2-10,6
MBG*					
OR				1,03	1,02
95%CI				0,97-1,1	0,96-1,09
MMMg**					
OR				1,01	0,99
95%CI				0,98-1,03	1,94-1,0
AUC	0,82	0,7	0,86	0,76	0,86

W tabeli przedstawiono *średnią glikemię w profilu dobowym oraz **maksymalną glikemię w profilu dobowym.

Tabela 16. AUC oraz ilorazy szans wystąpienia makrosomii skorygowane względem BMI i wieku dla 1,5-AG, HbA_{1c} oraz glikemii w SMBG.

makrosomia	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5
1,5-AG					
OR	0,17		0,18		0,15
95%CI	0,06-0,46		0,06-0,55		0,04-0,5
HbA_{1c}					
OR		3,29	2,85	2,9	2,8
95%CI		1,39-7,79	0,95-8,6	1,15-7,3	0,9-8,57
MBG*					
OR				1,02	1,01
95%CI				0,96-1,08	0,94-1,08
MMMg**					
OR				1,01	0,98
95%CI				0,99-1,03	0,95-1,02
AUC	0,85	0,68	0,88	0,74	0,88

W tabeli przedstawiono *średnią glikemię w profilu dobowym oraz **maksymalną glikemię w profilu dobowym (SMBG).

4.5.3. Analiza użyteczności klinicznej 1,5-AG jako predyktora makrosomi i LGA metodą ROC

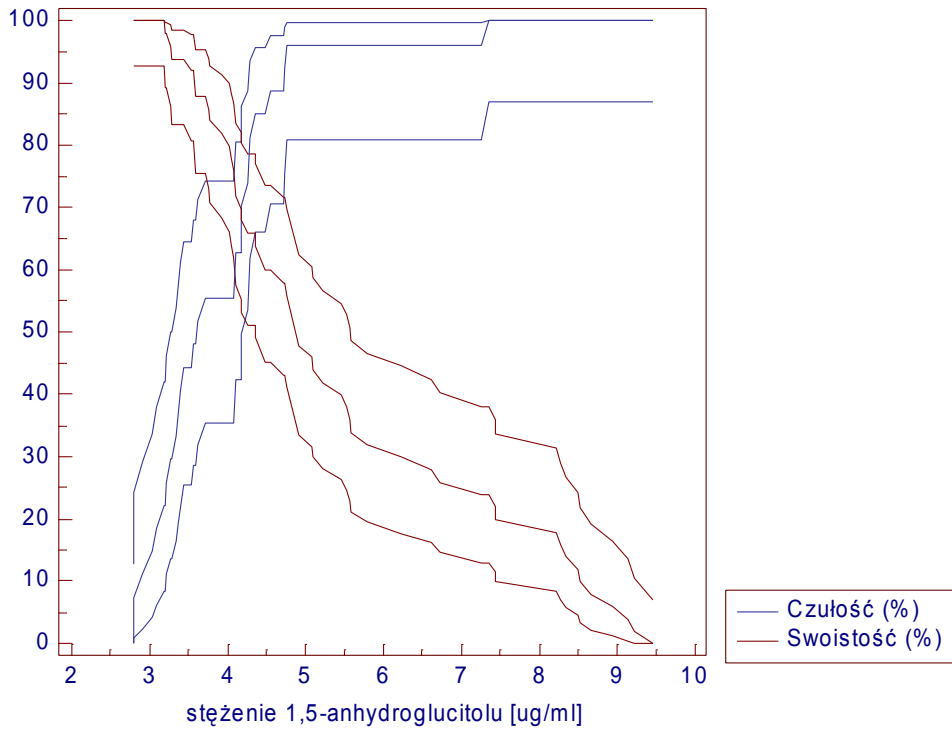
W analizie z wykorzystaniem krzywej ROC stężenie 1,5-AG w III trymestrze ciąży w badanej grupie ciężarnych z T1DM było istotnym wskaźnikiem ryzyka noworodkowej LGA (AUC = 0,81; 95% CI: 0,7-0,89; $p < 0,0001$) oraz makrosomii (AUC=0,84; 95% CI: 0,74-0,91; $p < 0,0001$).

Wyniki analizy ROC – zależność pomiędzy czułością i swoistością 1,5-AG oraz krzywą ROC dla stężenia 1,5-AG w III trymestrze ciąży jako markera LGA przedstawia Rycina 16. Najwyższą wartość AUC uzyskano dla stężenia 1,5-AG równego 4,76 $\mu\text{g/ml}$. Czułość wynosiła 96,3% (95% CI: 81,0 – 99,9), swoistość 55% (95%CI: 40,3-68,9). PPV wynosiła 53,7% (95% CI: 38,1-67,6), NPV zaś 96,6% (95%CI: 82,2- 99,9).

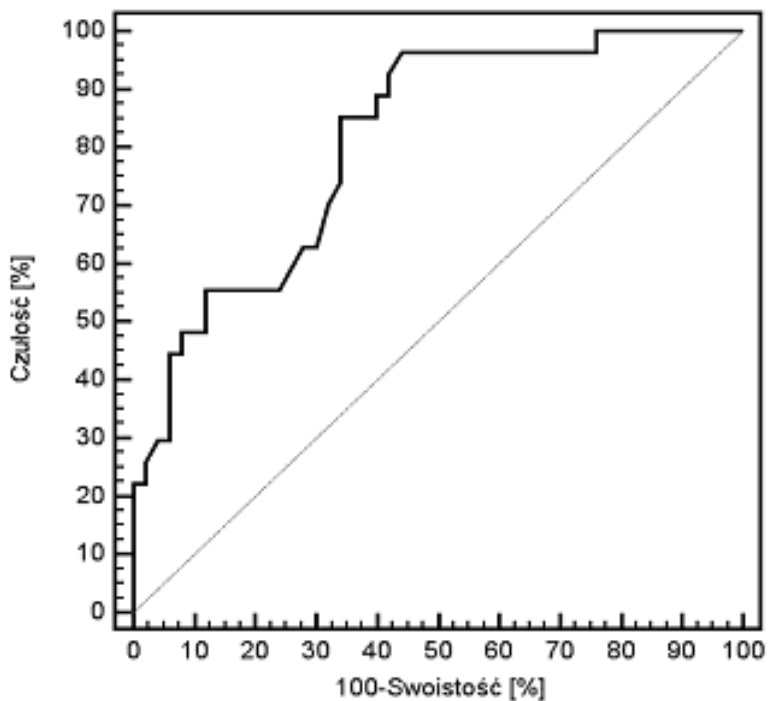
Krzywą ROC dla makrosomii przedstawiono na Rycinie 17. Najwyższą wartość AUC oszacowano dla stężenia 1,5-AG równego 4,28 $\mu\text{g/ml}$. Czułość wynosiła 95,2% (95% CI: 76,2 – 99,9), swoistość 65% (95% CI: 51,1-77,1), PPV wynosiła 51% (95% CI: 33,8-66,2), NPV zaś 97,4% (95% CI: 86,2-99,9).

Rycina 16. Wyniki analizy ROC dla 1,5-AG jako markera LGA.

a) Relacja pomiędzy czułością i swoistością 1,5-AG w ocenie ryzyka LGA

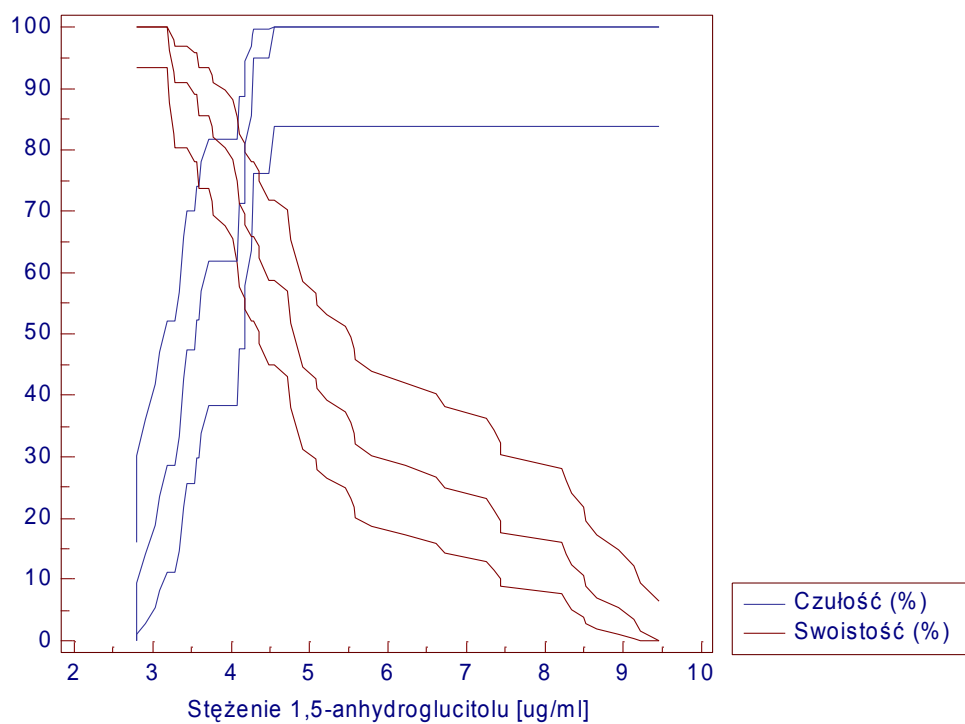


b) Krzywa ROC dla 1,5-AG jako markera LGA

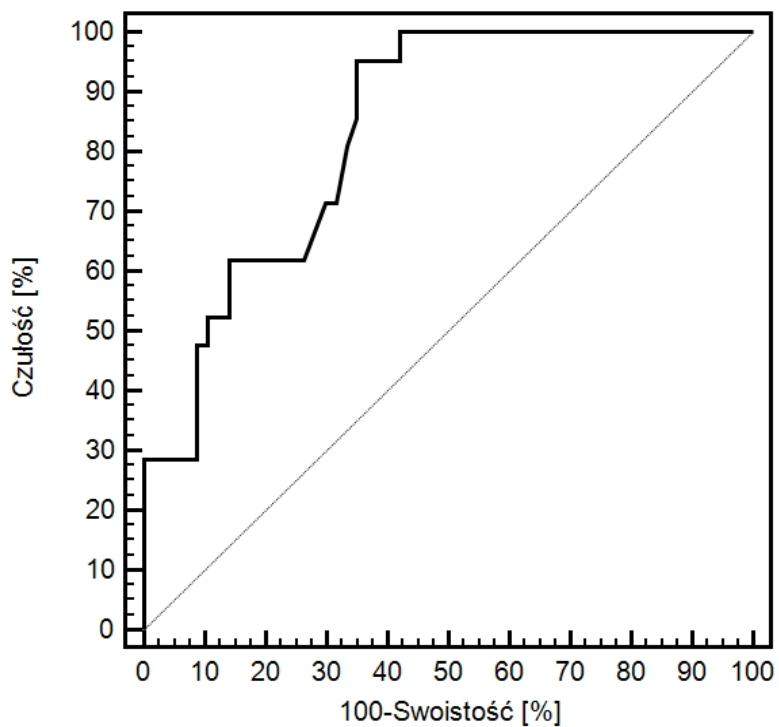


Rycina 17. Wyniki analizy ROC dla 1,5-AG jako markera makrosomii.

a) relacja pomiędzy czułością i swoistością 1,5-AG



b) krzywa ROC 1,5-AG jako markera makrosomii



5. DYSKUSJA

Niniejsza praca stanowi pierwsze systematyczne badanie mające na celu ocenę 1,5-AG jako markera wyrównania metabolicznego w ciąży powikłanej T1DM.

Pierwszy etap projektu stanowiła ocena stężenia 1,5-AG u ciężarnych z T1DM oraz grupy kontrolnej, którą przeprowadzono dla każdego z trymestrów ciąży. Następnym celem była ocena 1,5-AG jako markera wyrównania glikemii u pacjentek z T1DM, obejmująca między innymi jego porównanie z innymi parametrami oceny kontroli metabolicznej. Powyższe zasadnicze cele uzupełniało oznaczenie korelacji pomiędzy 1,5-AG a masą urodzeniową noworodka w badanej grupie z T1DM oraz ocena jego przydatności jako predyktora makrosomii w ciąży powikłanej T1DM.

1,5-AG jest krótkoterminowym wskaźnikiem wyrównania metabolicznego, oceniającym glikemię w okresie 1-2 tygodni poprzedzających pomiar [44]. W odróżnieniu od innych markerów biochemicznych kontroli glikemii (choćby HbA_{1c}, FA) stężenie 1,5-AG identyfikuje obecność pojedynczych, krótkotrwałych epizodów hiperglikemii, na przykład PPHG, a nie tylko wartość średniego stężenia glukozy we krwi [57-62]. Biorąc pod uwagę wymienione właściwości 1,5-AG, wydawał się on bardzo interesującym potencjalnym narzędziem oceny wyrównania metabolicznego w ciąży powikłanej T1DM, która wymaga szczególnie precyzyjnej kontroli glikemii. Z drugiej strony wiadomo było, że szybkość wydalania 1,5-AG zależy od wartości progu nerkowego dla glukozy, który w ciąży jest obniżony i wynosi około 140 mg/dl [65]. Wobec powyższego wartość 1,5-AG jako markera wyrównania glikemii w tej grupie wymagała odrębnych badań. W sytuacji, w której nie dysponujemy idealnym narzędziem oceny glikemii u ciężarnej, celowość badań mających na celu udzielenie jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, co do możliwości praktycznego wdrożenia 1,5-AG do praktyki klinicznej w tej grupie pacjentek miała pełne uzasadnienie. Uprzednio przeprowadzono jedynie jedno niewielkie badanie sugerujące możliwość zastosowania 1,5-AG

do oceny kontroli metabolicznej w heterogennej klinicznie pod względem typu choroby grupie kobiet ciężarnych z cukrzycą [90]. Niniejsza rozprawa doktorska stanowi pierwsze szerokie naukowe opracowanie tego zagadnienia.

Cel 1. Ocena stężenia 1,5-AG u ciężarnych z T1DM oraz w ciąży fizjologicznej

Stężenie 1,5-AG oznaczono u 110 kobiet w ciąży powikłanej T1DM oraz 102 kobiet z grupy kontrolnej, którą stanowiły ciężarne bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Na etapie planowania badania rozważano oznaczenie stężenia 1,5-AG w obydwu grupach przy użyciu proponowanej w piśmiennictwie techniki Yabuuchi i wsp. [69]. W tym celu, wykonano analizy mające na celu optymalizację oznaczeń, opierając się na procedurze spektrofotometrycznej detekcji produktów reakcji enzymatycznej 1,5-AG, po jego wcześniejszym wyodrębnieniu (wyizolowaniu) z próbek surowicy metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) z dwuwarstwowym wypełnieniem jonitowym. Następnie wykonywano pomiar spektrofotometryczny nadtlenu wodoru będącego koproduktem reakcji utleniania 1,5-AG. Procedurę oznaczeń 1,5-AG tą metodą scharakteryzowano szczegółowo we wstępie niniejszej rozprawy doktorskiej. Biorąc pod uwagę fakt, że najniższe stężenie 1,5-AG wyznaczone w grupie ciężarnych z T1DM było bliskie limitu pomiaru tej metody przy niezadowalającej precyzji, celowym wydało się przeprowadzenie oznaczeń i potwierdzenie uzyskanych wyników zmodyfikowaną lub całkowicie odmienną metodą. W celu udoskonalenia tej metody należałoby zmienić zarówno warunki ekstrakcji SPE w celu zwiększenia selektywności ekstrakcji i wzbogacenia 1,5-AG w próbkach (rodzaj złoża w kolumnie SPE, rodzaj i objętość wymywającego rozpuszczalnika, czas suszenia złoża i czas ekstrakcji), jak też być może parametry reakcji enzymatycznej, np. czas reakcji wymagany do ustalenia się równowagi reakcji. Jednakże ze względu na złożoność procedury (ekstrakcja - reakcja enzymatyczna - oznaczenie spektrofotometryczne) i długi czas pojedynczego oznaczenia (ok. 2-3 godzin),

korzystniejszym rozwiązaniem wydawało się zastosowanie innej metody analitycznej. Na podstawie dostępnej literatury za wartościową pod względem selektywności i czułości metodę dla oznaczeń 1,5-AG można uważać analizę chromatograficzną GC/MS lub HPLC/MS, pozwalającą na rozdział i jednoczesne oznaczenie stężenia cukrów obecnych w surowicy w stężeniach rzędu ng/ml. Inną metodą, niedawno wprowadzoną dla oznaczania 1,5-AG, cechującą się niskimi kosztami, jest metoda immunochemiczna (ELISA) [76, 77]. Nie wymaga ona selektywnego wyodrębniania 1,5-AG z surowicy, a opiera się na reakcji immunochemicznej z zastosowaniem swoistego dla tej substancji przeciwciała oraz cechuje się wysoką czułością detekcji i powtarzalnością oznaczeń. Te cechy zadecydowały o jej wyborze do niniejszej rozprawy doktorskiej.

Stężenie 1,5-AG w surowicy krwi u kobiet będących w fizjologicznej ciąży wynosiło około 13 µg/ml i było prawie trzykrotnie wyższe w porównaniu do grupy z T1DM. Potwierdza to wyniki uzyskane przez Tetsuo i wsp., którzy w badaniach w populacji fińskiej obserwowali statystycznie istotną różnicę pomiędzy stężeniem 1,5-AG u pacjentek z PGDM w porównaniu do ciężarnych w fizjologicznej ciąży [80]. Stężenie 1,5-AG w surowicy ciężarnych z T1DM oznaczone za pomocą techniki immunoenzymatycznej wyniosło w niniejszym badaniu 5,1 µg/ml (mediana 4,2 µg/ml), co jest zbliżone do średniego stężenia 1,5-AG w grupie z PGDM (n=54 osoby) w badaniach Tetsuo i wsp. (średni poziom 4,6 µg/ml) przeprowadzonych metodą chromatografii gazowej w połączeniu z detektorem FID [80]. Stężenie 1,5-AG w badanej grupie z T1DM było niższe od średniego poziomu 1,5-AG wykazanego metodą SPE przez Dworacką i wsp. (średni poziom 12 µg/ml, przy CV=7,9%), jednakże uzyskiwane w cytowanej pracy wartości opierają się głównie na wynikach oznaczeń w cukrzycy ciążowej [90]. Biorąc pod uwagę fakt, że stopień hiperglikemii w większości przypadków GDM jest mniejszy niż w T1DM, to obserwowana różnica stężeń 1,5-AG wydaje się być zgodna z oczekiwaną. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, nie zaobserwowano także - w przeciwieństwie do grupy

kontrolnej - zależności pomiędzy stężeniem 1,5-AG a czasem trwania ciąży powikłanej T1DM, co może być związane z dużą ilością epizodów hiperglikemii powyżej progu nerkowego dla glukozy i generalnie niskim poziomem badanego markera. Analiza statystyczna nie wykazała także istotnej różnicy w wartościach wskaźników wyrównania metabolicznego w SMBG w trakcie przebiegu ciąży u pacjentek z T1DM.

Cel 2. Analiza korelacji między 1,5-AG oraz HbA_{1c} a parametrami wyrównania metabolicznego uzyskanymi na podstawie dobowego profilu glikemii oraz CGMS

Ważnym celem niniejszego projektu była ocena zależności pomiędzy 1,5-AG oraz HbA_{1c} a wybranymi indeksami wyrównania glikemii w ciąży powikłanej T1DM. Były to parametry uzyskane na podstawie pomiarów glikemii w okresie 7 dni poprzedzających pomiar 1,5-AG na podstawie 8-punktowego profilu glikemii wykonywanego samodzielnie przez pacjentki za pomocą glukometru (SMBG) oraz – u części pacjentek - CGMS. Ta ostatnia metoda jest wykorzystywana w praktyce klinicznej w szczególnych przypadkach i nie ma jeszcze charakteru rutynowego.

Na podstawie uzyskanych wyników poziom 1,5-AG lepiej niż HbA_{1c} odzwierciedlał uzyskiwane uśrednione wartości średniej i maksymalnej glikemii mierzonej glukometrem w ciągu 7 dni bezpośrednio poprzedzających pomiar badanego markera. Zgodnie z oczekiwaniami stężenie 1,5-AG było niższe w grupie ze stężeniem HbA_{1c} wyższym od 6,1% oraz wyższymi wartościami średniej glikemii oraz maksymalnej glikemii. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że kobiety nie uzyskujące kryteriów wyrównania metabolicznego HbA_{1c} miały niższy poziom 1,5-AG w porównaniu z grupą kobiet z rekomendowaną wartością hemoglobiny glikowanej. Należy jednak zauważyć, że kobiety z prawidłowym stężeniem HbA_{1c} charakteryzowała duża różnorodność w zakresie stężeń 1,5-AG. Ta obserwacja pozwala przypuszczać, że pacjentki wykazujące podobną wartość HbA_{1c}

wykazują znaczące różnice w zakresie występowania krótkich epizodów hiperglikemii, które wpływają znacząco na poziom 1,5-AG, ale w znacznie mniejszym stopniu na poziom HbA_{1c}. Zgodnie z oczekiwaniami, zaobserwowano istotną statystycznie korelację pomiędzy stężeniem 1,5-AG a pozostałymi wskaźnikami kontroli glikemii. Uzyskano znamienne wartości współczynnika korelacji pomiędzy 1,5-AG a parametrami uzyskanymi w SMBG - średnią maksymalną glikemią, średnią glikemią oraz jej odchyleniem standardowym. Wykazano także, że wartość poszczególnych współczynników korelacji była podobna dla wszystkich trzech trymestrów ciąży. Miało to miejsce pomimo zmieniającego się progu nerkowego dla glukozy. Sugeruje to, że poziom glikemii miał znacząco większy wpływ na poziom 1,5-AG niż zmiany w progu nerkowym. W końcu, porównując współczynniki korelacji 1,5-AG z glikemią w SMBG oraz HbA_{1c} z glikemią w SMBG wykazano, że korelacja pomiędzy 1,5-AG a maksymalnym stężeniem glukozy w profilu dobowym była istotnie wyższa niż zależność HbA_{1c} z glikemią. Obserwacja ta jest zgodna z wynikami uprzednich badań przeprowadzonych w T1DM i T2DM oraz osób z nieprawidłową tolerancją glukozy, w których poziom 1,5-AG obniżał się w przypadku pogorszenia wyrównania metabolicznego wykazując silną korelację z wartościami maksymalnej glikemii w profilu dobowym u pacjentów z optymalnym poziomem HbA_{1c} [57-61].

Wyniki uzyskane na podstawie SMBG potwierdzono i rozszerzono dokonując oceny zależności 1,5-AG z wartościami uzyskanymi z wykorzystaniem systemu CGMS GuardianRT rejestrującego stężenie glukozy w czasie rzeczywistym. Metoda ta jest aktualnie uznawana za 'złoty standard' stanowiąc punkt odniesienia stosowany w wielu badaniach naukowych, między innymi dla oceny testów oceniających wyrównanie glikemii [2, 37, 62, 92-94]. Szczególna wartość pomiarów CGMS wynika z faktu, że uwzględniają one dodatkowe informacje na temat czasu trwania epizodów hiperglikemii, ich amplitudy oraz umożliwiają rejestrację hipoglikemii. Trzeba dodać, że w kilku poprzednich badaniach przeprowadzonych

przy użyciu technologii CGMS wykazywano obecność krótkotrwałej hiperglikemii, nieuchwytej przy użyciu rutynowych metod monitorowania u ciężarnych z T1DM [2, 92-94]. W niniejszej pracy, pomiar CGMS przeprowadzono dla około połowy badanej grupy ciężarnych z T1DM, w tym u 12 osób w I, po około 20 w II i III trymestrze ciąży. Obecnie jest to największe badanie oceniające zależność 1,5-AG z parametrami CGMS oraz pierwsze badanie tego rodzaju w ciąży.

Obserwowane zależności pomiędzy 1,5-AG a CGMS pozostawały w zgodności z wynikami uzyskanymi na podstawie SMBG. Po pierwsze, potwierdzono korelację 1,5-AG ze standardowymi parametrami uzyskanymi na podstawie CGMS - średnią maksymalną glikemią, średnią glikemią oraz odchyleniem standardowym glikemii. Zaobserwowano istotną ujemną korelację 1,5-AG z wartościami średniej i maksymalnej glikemii rejestrowanej za pomocą CGMS. Stężenie HbA_{1c} korelowało istotnie jedynie ze średnim stężeniem glukozy w CGMS oraz polem pod krzywą dla hipoglikemii, co jest zapewne spowodowane faktem, że hemoglobina glikowana odzwierciedla poziom glukozy w długim okresie czasu oraz wpływem hipoglikemii na jej stężenie. Należy także zauważyć, że we wcześniejszych badaniach oceniających glikemię w ciąży nie odnotowano związku HbA_{1c} z PPHG rejestrowanych za pomocą CGMS; autorzy jako przyczynę takiego stanu rzeczy wskazują dodatkowo liczebność badanych przez nich grup oraz krótki okres monitorowania [92-94].

Nową jakością w niniejszej rozprawie była ocena związku 1,5-AG z polem pod krzywą dla glikemii. Za wartość graniczną glikemii przyjęto poziom 140 mg/dl, a więc nieco wyższy niż aktualnie przyjmowane w Polsce kryterium maksymalnej glikemii dla ciężarnych z cukrzycą [4]. Należy w tym miejscu przytoczyć argumenty przemawiające za wyborem powyższej wartości granicznej. Po pierwsze, w momencie rozpoczynania niniejszego projektu zalecenia PTD wskazywały wartość 140 mg/dl, jako kryterium wyrównania glikemii poposiłkowej w ciąży powikłanej cukrzycą. Po drugie, w aktualnie obowiązujących wytycznych przyjęto

wartość 120 mg/dl, która dotyczy 8-punktowego pomiaru przeprowadzanego glukometrem, natomiast nie określono w nich docelowych wartości glikemii na podstawie CGMS. Po trzecie, wartość 140 mg/dl odpowiada wartości progu nerkowego dla glukozy u ciężarnych. Obniżone wartości progu nerkowego dla glukozy w ciąży właśnie do 140 mg/dl powoduje, że 1,5-AG jest wydalany z organizmu przy relatywnie niższym stężeniu glukozy we krwi. Po czwarte, kierując się jakością życia pacjentek urządzenie CGMS programuje się w praktyce klinicznej w sposób, który sprawia, że system alarmujący nie utrudnia istotnie ich codziennego funkcjonowania przy sygnalizowaniu przekroczenia wartości progowej.

Stwierdzono istotną korelację stężenia 1,5-AG z AUC-140. Ponadto w modelu wieloczynnikowym wykazano, że 1,5-AG jest silniejszym niż HbA_{1c} oraz maksymalna glikemia w SMBG predyktorem AUC-140, co dowodzi, że jego stężenie najefektywniej obrazuje występowanie i nasilenie epizodów hiperglikemii. HbA_{1c} wykazywała słaby związek z AUC-140, bliski granicy znamienności statystycznej, natomiast maksymalna wartość glikemii w SMBG nie była niezależnym predyktorem AUC-140 w analizowanej grupie. Także we wcześniejszych badaniach z wykorzystaniem CGMS wykazano obecność krótkoterminowych epizodów hiperglikemii u ciężarnych z T1DM z prawidłowym wynikiem HbA_{1c} [92-94]. Ponadto wykazano, że krótkoterminowe zwwyżki glikemii mogą pozostać niewykryte w rutynowym 8-punktowym pomiarze glukometrem w ramach SMBG [2, 92].

Wyniki niniejszej części rozprawy wydają się być potencjalnie użyteczne ze względu na możliwość zastosowania 1,5-AG jako laboratoryjnego markera kontroli glikemii w praktyce klinicznej w ciąży powikłanej T1DM. Dotyczy to identyfikacji pacjentek z nieprawidłowym wyrównaniem glikemii w ciągu 1 tygodnia przed wizytą lekarską oraz oceny skuteczności leczenia hipoglikemizującego. W kilku uprzednich publikacjach analizujących kobiety ciężarne z T1DM nie udało się znaleźć związku między aktualnie stosowanymi metodami monitorowania a epizodami hiperglikemii widocznymi w CGMS [2, 92-94]. Także na

podstawie wyników niniejszej analizy żaden z uwzględnionych markerów, poza 1,5-AG, nie wykazywał zadowalającego związku z parametrami CGMS. Wobec braku wystarczająco skutecznych narzędzi analitycznych ocena wyrównania metabolicznego za pomocą 1,5-AG może okazać się w grupie ciężarnych pacjentek z T1DM szczególnie przydatna.

Cel 3. Ocena użyteczności klinicznej 1,5-AG jako markera hiperglikemii poposiłkowej

Uzyskane wyniki wykazały silny związek 1,5-AG z profilami glikemii, co stworzyło podstawę do przeprowadzenia oceny jego zdolności dyskryminacyjnej jako markera PPHG. W związku z tym przeprowadzono kolejne analizy statystyczne przy użyciu metody ROC, mające na celu odpowiedź na pytanie, czy 1,5-AG może stanowić użyteczny klinicznie marker ostrej PPHG, jakie są wartości odcięcia stężeń 1,5-AG w badanej populacji ciężarnych i ewentualnie możliwości interpretacji w oparciu o wynik 1,5-AG w indywidualnym przypadku.

Punkt odniesienia w analizie ROC stanowiła wartość średniej maksymalnej glikemii uzyskana na podstawie pomiarów glukometrycznych w okresie 1 tygodnia. Odnosząc się do sformułowania „hiperglikemia poposiłkowa” użytego w niniejszej rozprawie należy stwierdzić, że zdecydowana większość obserwowanych zwyżek glikemii w T1DM ma miejsce po posiłku. Powszechnie cytowane badania przeprowadzone przez Monier i wsp. wykazały, że przy bardzo dobrym wyrównaniu metabolicznym mierzonym poziomem HbA_{1c} hiperglikemie dotyczą w zasadzie jedynie okresu poposiłkowego [95]. W ocenie uwzględniono wartość odcięcia hiperglikemii na poziomie 140 oraz 120 mg/dl. Pierwsze kryterium założone jeszcze na etapie planowania badań odpowiadało wartości progowi nerkowemu dla glukozy, a więc wartości glikemii przy której 1,5-AG jest eliminowany z organizmu, oraz obowiązującym do roku 2008 kryterium PTD wyrównania cukrzycy w ciąży. Drugą wartość odcięcia dodano po opublikowaniu nowych, obowiązujących od 2010 roku, kryteriów wyrównania metabolicznego

dotyczących PPHG u ciężarnych z cukrzycą dla pomiarów glukometrycznych w 1 godzinę po posiłku.

Analiza pola pod krzywą ROC 1,5-AG potwierdziła jego użyteczność diagnostyczną w wykrywaniu hiperglikemii dla obu wybranych kryteriów PPHG. Najwyższą wartość AUC dla glikemii powyżej 140 mg/dl uzyskano dla punktu odcięcia stężenia 1,5-AG w surowicy na poziomie 4,8 μ g/ml. Dla tak przyjętej wartości, ocena poziomu 1,5-AG u chorej z T1DM pozwoliła na stwierdzenie PPHG z 82,4% czułością i 81,3% swoistością. Dla oceny PPHG powyżej 120 mg/dl uzyskane AUC było nieco niższe niż 140 mg/dl i wynosiło 0,8 przy niższej swoistości (około 70%). Należy też odnieść się do kwestii zastosowania średniej wartości maksymalnej wartości glikemii, podczas gdy zalecenia PTD odnoszą się do pojedynczych wartości maksymalnej glikemii poposiłkowej (w aktualnych zaleceniach na poziomie 120 mg/dl) [4]. Trzeba wyjaśnić, że w realiach praktyki klinicznej, mimo że opisywana grupa pacjentek z T1DM była znakomicie wyrównana metabolicznie w odniesieniu do poziomu HbA_{1c}, szczególnie na tle doniesień z innych ośrodków, wszystkie pacjentki doświadczały choćby pojedynczych epizodów glikemii powyżej rekomendowanego progu.

Uzupełnieniem przeprowadzonych analiz była ocena 1,5-AG w odniesieniu do wartości glikemii na podstawie pomiaru CGMS. Dla kryterium PPHG 140 mg/dl w CGMS, uzyskane wartości AUC oraz czułości były nieco wyższe niż dla kryterium glikemii w SMBG. W analizowanej grupie odsetek chorych osiągających kryterium, 120 mg/dl wynosił 4% (2 osoby). Taka sytuacja uniemożliwia próbę zastosowania powyższego kryterium w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Uzyskane w tej części wyniki sugerują skuteczność monitorowania ciężarnych z T1DM w oparciu o stężenie 1,5-AG. Trzeba jednak zwrócić uwagę na stosunkowo niską swoistość diagnostyczną 1,5-AG jako markera PPHG powyżej 120 mg/dl.

Cel 4. Poszukiwanie związku pomiędzy poziomem 1,5-AG a wybranymi wynikami położniczymi ciąży w prównaniu z innymi metodami monitorowania glikemii

Kolejnym celem niniejszego badania była ocena związku pomiędzy stężeniem 1,5-AG a masą urodzeniową noworodka w ciąży powikłanej T1DM. W minionych dekadach ponad wszelką wątpliwość wykazano wpływ wyrównania metabolicznego na rozwój płodu oraz wynik położniczy ciąży powikłanej T1DM [20-22, 28-36]. Wiele kwestii pozostało wciąż nierozwiązanych, na przykład problem opracowania odpowiednio czułych i swoistych markerów prognostycznych dla niepożądanych zdarzeń położniczych.

Najczęstszym powikłaniem ciąży z T1DM jest noworodkowa makrosomia i LGA [20-22]. Uprzednio publikowane badania dotyczące relacji HbA_{1c} z przebiegiem ciąży w T1DM dowiodły, że nawet kiedy jej poziom utrzymywał się w granicach przyjętych międzynarodowych kryteriów wyrównania metabolicznego, to ryzyko niepowodzeń położniczych u ciężarnych z T1DM pozostawało znacząco wyższe niż w populacji ogólnej. Na przykład, w wielośrodkowym badaniu Evers i wsp. w grupie ciężarnych z T1DM 90% badanych kobiet miała prawidłowy wynik HbA_{1c}, tymczasem odsetek noworodków, u których stwierdzono makrosomię sięgał blisko 50% [20]. W kilku innych wcześniejszych badaniach dotyczących oceny glikemii w T1DM nie wykazano związku pomiędzy HbA_{1c} a ryzykiem wyższej masy urodzeniowej [96, 98, 99, 100, 101]. Wynika z tego jasno, że ocena poziomu HbA_{1c} nie jest wystarczającą strategią monitorującą w ocenie ryzyka nieprawidłowej masy noworodka. Najbardziej prawdopodobną z przyczyn może być wspomniany wcześniej słaby związek tego markera z istniejącymi krótkoterminowymi zwyżkami glikemii, w tym PPHG, które mogą w sposób istotny przyczyniać się do utrzymującego się ciągle wysokiego ryzyka niepowodzeń położniczych u pacjentek z T1DM pomimo uzyskiwania obowiązujących kryteriów wyrównania metabolicznego. Należy zauważyć, że także w wynikach niniejszej pracy wyrównanie HbA_{1c} na rekomendowanym poziomie nie eliminowało ryzyka makrosomii i

LGA w badanej grupie. Natomiast w dotychczasowych badaniach przeprowadzonych nad oceną 1,5-AG wykazano, że jest on najbardziej czułym markerem ostrej hiperglikemii [57-62]. Pozwala to przypuszczać, że stężenie 1,5-AG może stanowić marker ryzyka niepowodzeń położniczych w ciąży powikłanej cukrzycą.

W niniejszej pracy oceniano związek pomiędzy 1,5-AG a masą urodzeniową noworodka oraz porównywano go do innych metod oceny glikemii. W tym celu przeanalizowano stężenia poszczególnych markerów w II i III trymestrze ciąży w grupach matek noworodków z LGA oraz prawidłową masą ciała. W tych okresach udowodniono wpływ wyrównania glikemii w ciąży powikłanej cukrzycą na masę urodzeniową płodu. Trzeba zwrócić uwagę, że w Polsce brak jest aktualnej siatki percentylowej dla masy urodzeniowej noworodków; tego narzędzia brakuje także dla regionu Małopolski. Dlatego też w niniejszej rozprawie użyto siatki z regionu łódzkiego z roku 2008 [91]. Wydaje się jednak, że brak jest przesłanek, aby zakładać, że między regionem łódzkim a małopolskim istnieją istotne różnice, które mogłyby wpłynąć na uzyskane wyniki

Po pierwsze, zaobserwowano, że stężenie 1,5-AG w II i III trymestrze ciąży różniło się istotnie pomiędzy badanymi grupami z LGA oraz ciężarnymi, które urodziły dziecko z prawidłową masą ciała. Po drugie, stwierdzono silną, ujemną korelację pomiędzy stężeniem 1,5-AG u matki w II i III trymestrze a masą noworodka. Ponadto, wyniki przeprowadzonych analiz statystycznych w modelach wieloczynnikowych pozwalają wnioskować, że poziom 1,5-AG może stanowić najsilniejszy wskaźnik masy urodzeniowej w badanej grupie. W porównaniu do pozostałych uwzględnionych czynników, takich jak BMI przed ciążą, stężenia HbA_{1c} oraz glikemii w SMBG, tylko poziom 1,5-AG w III trymestrze ciąży był niezależnym wskaźnikiem masy urodzeniowej. Średnie i maksymalne stężenie glukozy w SMBG oraz stężenie HbA_{1c} korelowały istotnie z masą urodzeniową dziecka, nie były jednak niezależnymi predyktorami masy urodzeniowej. Analiza metodą regresji logistycznej wykazała istotne zmniejszenie ryzyka

makrosomii i LGA przy wzroście 1,5-AG o 1 $\mu\text{g/ml}$. W modelu wieloczynnikowym, wzrost stężenia 1,5-AG o 1 $\mu\text{g/ml}$ powodował około 3-krotny spadek ryzyka LGA oraz ponad 5-krotny spadek ryzyka makrosomii, niezależnie od pozostałych czynników. Porównując kolejno utworzone modele wieloczynnikowe, zaobserwowano, że uwzględnienie 1,5-AG zwiększało skuteczność przewidywania ryzyka tych powikłań w porównaniu do modeli opartych o poziom wskaźników uzyskanych na podstawie standardowych metod oceny wyrównania glikemii (HbA_{1c} , glikemia w SMBG). Najwyższą wartość predykcyjną dla makrosomii i LGA ($\text{AUC}=0,88$ i $\text{AUC}=0,86$) uzyskano dla modelu uwzględniającego zarówno HbA_{1c} jak i 1,5-AG.

Przedstawione wyniki potwierdzają założenie, że stężenie 1,5-AG u matki z T1DM w III trymestrze ciąży może być istotnym predyktorem masy noworodka. Niniejsza praca stanowi pierwsze na świecie badanie oceniające związek stężenia 1,5-AG u ciężarnej z masą urodzeniową płodu. Potrzebne są jednak dalsze badania w tym zakresie, w tym między innymi badania interwencyjne, które oceniłyby potencjalną skuteczność monitorowania ukierunkowanego na poziom 1,5-AG w odniesieniu do masy położniczej.

Cel 5. Ocena wartości klinicznej 1,5-AG jako markera makrosomii i LGA

Badania mające na celu identyfikację czynników prognostycznych masy urodzeniowej płodu mogą być pomocne do oceny zagrożenia makrosomią oraz w konsekwencji umożliwić szybsze i skuteczniejsze jej zapobieganie. Jak dotychczas nie udało zidentyfikować takiego markera, który z wystarczającą czułością i swoistością identyfikowałby ryzyko noworodkowej makrosomii w ciąży powikłanej T1DM.

Przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki analiz metodą ROC potwierdzają założenie, że stężenie 1,5-AG u matki w III trymestrze ciąży może być potencjalnie użytecznym wskaźnikiem prognostycznym nieprawidłowej masy urodzeniowej noworodka.

Przemawia to za potencjalną przewagą monitorowania w praktyce klinicznej poziomu 1,5-AG i modyfikowaniem terapii na tej podstawie w stosunku do opierania się na poziomie HbA_{1c}, który jest odzwierciedleniem długoterminowej kontroli średniej glikemii ulegającym powolnym zmianom. Uzyskany wynik pola pod krzywą ROC (AUC>0,8) wskazuje na dobrą zdolność dyskryminacyjną 1,5-AG w ocenie ryzyka noworodkowej LGA oraz makrosomii. Ocena stężenia 1,5-AG u ciężarnej w III trymestrze pozwoliła na stwierdzenie ryzyka noworodkowej makrosomii z 95% czułością i 65% swoistością przy wartościach stężenia poniżej 4,28 µg/ml. Dla oceny ryzyka LGA uzyskano wartości czułości równej 96% przy nieco niższej swoistości. Dokonując oceny zdolności dyskryminacyjnej HbA_{1c} oraz glikemii w SMBG stwierdzono, że ich stężenia w II i III trymestrze ciąży nie rozróżniały istotnie grup pacjentek, które urodziły dziecko z LGA od matek dzieci z prawidłową masą urodzeniową (AUC=0,6–0,7). Warto odnieść się do wyników uprzednich badań oceniających wartość kliniczną tych metod monitorowania glikemii w prognozowaniu masy urodzeniowej płodu. Podobnie jak w wynikach niniejszej pracy, obserwowano wyższe stężenia HbA_{1c} i glikemii w SMBG u matek noworodków z LGA lub makrosomią, nie wykazywały one jednak zadowalającej użyteczności klinicznej jako marker ryzyka LGA, co wiąże się być może z ich niską czułością w stosunku do hiperglikemii poposiłkowej. Na przykład, przeprowadzona przez Evers i wsp. ocena w grupie 300 ciężarnych z T1DM uwzględniająca stężenie HbA_{1c} oraz maksymalną glikemię w SMBG w II i III trymestrze ciąży wykazała, że w oparciu o te parametry nie można skutecznie przewidzieć ryzyka rozwoju makrosomii u ciężarnej [20]. Także we wcześniejszych badaniach przeprowadzonych w populacji polskiej stężenie HbA_{1c} nie wykazywało ryzyka makrosomii u ciężarnych z T1DM – jej zdolność dyskryminacyjna (AUC) wyniosła zaledwie 0,66 przy niskiej czułości równej 23%, i specyficzności 91%. [101]. Biorąc pod uwagę wcześniejsze publikacje oraz wyniki niniejszej pracy, 1,5-AG wydaje się być skuteczniejszym narzędziem oceny ryzyka makrosomii i LGA w porównaniu do innych

metod. Dlatego celowym wydaje się przeprowadzenie dalszych badań nad jego zastosowaniem jako wskaźnika wyższej masy urodzeniowej oraz innych powikłań ciąży powikłanej cukrzycą. Po pierwsze, należałoby potwierdzić uzyskane wyniki w większych populacjach, co będzie być może wymagać badań wieloośrodkowych. Ponadto, konieczne jest potwierdzenie kryterium odcięcia 1,5-AG dla LGA i makrosomii. W dalszym etapie należałoby również ocenić ewentualną efektywność terapii opartej na monitorowaniu kontroli glikemii za pomocą 1,5-AG w poprawie rokowania w odniesieniu do wystąpienia tych powikłań u dziecka. W końcu trzeba stwierdzić, że na ewentualne wejście do praktyki klinicznej zastosowania 1,5-AG jako markera biochemicznego makrosomii może mieć jedynie znaczenie pomocnicze i uzupełniające w stosunku do będących w użyciu metod oceny masy położniczej, głównie ultrasonograficznych [103]. Nie budzi wątpliwości, że oznaczenie stężenia 1,5-AG może natomiast znaleźć zastosowanie w dostosowywaniu terapii celem redukcji powikłań położniczych.

Wobec wejścia na rynek tanich zestawów ELISA do oznaczania 1,5-AG należy przewidywać upowszechnienie wykonywania tego pomiaru. Wyniki niniejszej pracy doktorskiej być może pozwolą przyspieszyć jego wprowadzenie do codziennej praktyki klinicznej związanej z opieką nad ciężarną z T1DM. Przemawiają one za użytecznością 1,5-AG jako narzędzia oceniającego kontrolę glikemii u ciężarnej z T1DM oraz wartościowego markera oceniającego ryzyko makrosomii i LGA.

6. WNIOSKI

1. Stężenie 1,5-AG u ciężarnych z T1DM jest znamienne niższe w porównaniu do grupy kontrolnej bez cukrzycy. W poszczególnych trymestrach ciąży powikłanej T1DM stężenie 1,5-AG nie wykazuje znamienych różnic. Stężenie 1,5-AG u pacjentek z T1DM uzyskujących kryteria wyrównania metabolicznego wyrażone poziomem HbA_{1c} jest istotnie wyższe niż u kobiet, które tych kryteriów nie spełniają.
2. Stężenie 1,5-AG jest silniejszym wskaźnikiem parametrów kontroli glikemii opartych na SMBG i CGMS niż HbA_{1c}.
3. 1,5-AG jest użytecznym markerem hiperglikemii poposiłkowej u ciężarnych z T1DM.
4. Stężenie 1,5-AG w II i III trymestrze ciąży powikłanej T1DM koreluje z masą urodzeniową noworodka i jest niższe w ciążach zakończonych urodzeniem dziecka o prawidłowej masie ciała. 1,5-AG wykazuje najsilniejszy związek z masą urodzeniową noworodka w porównaniu do innych metod oceny kontroli metabolicznej.
5. Obniżone stężenie 1,5-AG w surowicy w III trymestrze ciąży powikłanej T1DM może być uznawane za istotny czynnik prognostyczny noworodkowej LGA oraz makrosomii.
6. 1,5-AG wydaje się być wartościowym markerem wyrównania metabolicznego u ciężarnych z T1DM.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Diabetes care and research in Europe: The Saint Vincent Declaration. *Diab Med* 1990, 7: 360.
2. Kerssen A, de Valk HW, Visser GH: Do HbA_{1c} levels and the self-monitoring of blood glucose levels adequately reflect glycaemic control during pregnancy in women with type 1 diabetes mellitus? *Diabetologia* 2006, 49: 25–28.
3. Gabbe SG, Graves CG: Management of diabetes mellitus complicating pregnancy. *Obstet Gynecol* 2003, 102: 857-868.
4. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę, 2012. Stanowisko PTD, *Diabetologia Kliniczna*, 2012, tom 1, supl. A.
5. Garner P: Type 1 diabetes mellitus and pregnancy. *Lancet* 1995, 346: 157 – 161.
6. Casson IF, Clarke C, Howard C, McKendrick O, Pennycook S, Pharoah POD, Plat MJ, Stanisstreet M, Walkinshaw S: Outcomes of pregnancy in insulin dependent diabetic women: results of a five year population cohort study. *BMJ* 1997, 315: 275 – 278.
7. Reece A: Maternal Fuels, diabetic embryopathy: pathomechanisms and prevention. *Sem Reproductive Endo* 1999, 17: 183 – 194.
8. Jovanovic L, Knopp R, Kim H, Cefalu T, Zhu X, Lee J, Simpson JL, Mills JL: Elevated Pregnancy Losses at High and Low Extremes of Maternal Glucose in Early Normal and Diabetic Pregnancy Evidence for a protective adaptation in diabetes. *Diabetes Care* 2005, 28: 1113 – 1117.
9. Tyralla EE: The infant of diabetic mother. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1996, 23: 221-231.
10. Hay WW: Care of the infant of the diabetic mother. *Curr Diab Rep* 2012, 12: 4-15.

11. El Mallah KO, Narchi H, Kulayat NA, Shaban MS: Gestational and pregestational diabetes: comparison of maternal and fetal characteristics and outcome. *Int J Gynaecol Obstet* 1997, 58: 203-209.
12. Galindo A, Burguillo A, Azriel S, Fuente Pde L: Outcome of fetuses in women with pregestational diabetes mellitus. *J Perinat Med* 2006, 34: 323-331.
13. Jansson T, Wennergren M, Powell TL: Placental glucose transport and GLUT1 expression in insulin-dependent diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1999, 180: 163-168.
14. The Diabetes Control and Complications Study Group: Effect of Pregnancy on Microvascular Complications in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 2000, 23: 1084-1091.
15. V erier-Mine O, Chaturvedi N, Webb D, Fuller JH: Is pregnancy a risk factor for microvascular complications? The EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabet Med* 2005, 22: 1503-1509.
16. Botta RM: Congenital malformations in infants of 517 pregestational diabetic mothers. *Ann Ist Super Sanita* 1997, 33: 307-311.
17. Cypryk K, Wilczyński J, Loba J, Sobczak M, Dziegielewski K: Niepowodzenia  o oznicze w ci azy powikłanej cukrzyc  - badania własne. *Diabetol Pol* 1995, 2:12-17.
18. Aberg A, Westbom L, K all en B: Congenital malformations among infants whose mothers had gestational diabetes or preexisting diabetes. *Early Hum Dev* 2001, 61:85-95.
19. Lapolla A, Dalfr  M, Masin M, Bruttomesso D, Piva I, Crepaldi C, Tortul C, Dalla Barba B, Fedele D: Analysis of outcome of pregnancy in type 1 diabetics treated with insulin pump or conventional therapy. *Acta Diabetol* 2003, 40: 143-149.
20. Evers IM, de Valk HW, Visser GH: Risk of complications of pregnancy in women with type 1 diabetes: nationwide prospective study in the Netherlands. *BMJ* 2004, 328: 1484-1489.

21. Jovanovic-Peterson L, Peterson CM, Reed GF, Metzger BE, Mills JL, Knopp RH, Aarons JH: Maternal postprandial glucose levels and infant birth weight; the Diabetes in Early Pregnancy Study. *Am J Obstet Gynecol* 1991, 39: 103–111.
22. Nielsen GL, Meller M, Sorensen HT: HbA_{1c} in early diabetic pregnancy and pregnancy outcomes. A Danish population-based cohort study of 573 pregnancies in women with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2006, 29: 2612-2616.
23. Parretti E, Mecacci F, Papini M, Cioni R, Garigmani L, Mignosa M, Torre P, Mello G: Third-trimester maternal glucose levels from diurnal profiles in nondiabetic pregnancies: correlation with sonographic parameters of fetal growth. *Diabetes Care* 2001, 24: 1319-1325.
24. Yang X, Hsu-Hage B, Zhang H, Zhang C: Women with impaired glucose tolerance during pregnancy have significantly poor pregnancy outcomes. *Diabetes Care* 2002, 25: 1619-1624.
25. Remsberg K, Mckeown R, Mcfarland K, Irwin LS: Diabetes in pregnancy and cesarean delivery. *Diabetes Care* 1999; 22: 1561 – 1567.
26. Ray JG, Urqia ML: Risk of stillbirth at extremes of birth weight between 20 to 40 weeks gestation. *J Perinatol* 2012 [Epub ahead of print].
27. De Veciana M, Major C, Morgan M, Tamerou A, Toohey JS, Len JM, Evans AT: Postprandial versus preprandial blood glucose monitoring in women with gestational diabetes mellitus requiring insulin therapy. *N Engl J Med* 1995, 333: 1237-1241.
28. Jovanovic L: What is so bad about a big bay? *Diabetes Care* 2001, 24: 1317-1318.
29. Combs CA, Gunderson E, Kitzmiller JL, Gavin L, Main EK: Relationship of fetal macrosomia to maternal postprandial glucose control during pregnancy. *Diabetes Care* 1992, 15: 1251–1257.

30. Demarini S, Mimouni F, Tsang RC, Khoury J, Hertzberg V: Impact of metabolic control of diabetes during pregnancy on neonatal hypocalcemia: a randomized study. *Obstet Gynecol* 1994, 823: 918-922.
31. Manderson JG, Patterson CC, Hadden DR, Traub AJ, Ennis C, McCance DR: Preprandial versus postprandial blood glucose monitoring in type 1 diabetic pregnancy: A randomized controlled clinical trial. *Am. J of Obstet And Gynecol.* 2003, 189: 507-512.
32. El-Halwagy HE, Gelbaya TA, El-Wahab MF, El-Din S, Shebl AE, Makboul G: The Mean Third Trimester Postprandial Blood Glucose of Diabetic Pregnant Patients and Infant Birth Weight in the Kuwaiti Population. *Medscape Womens Health* 2001 6: 2.
33. Page RC, Kirk BA, Fay T, Wilcox M, Hosking DJ, Jeffcoate WJ: Is macrosomia associated with poor glycemic control in diabetic pregnancy? *Diabet Med* 1996, 13: 170-174.
34. Jovanovic-Peterson L, Peterson CM, Reed GF, Metzger BE, Mills JL, Knopp RH, Aarons JH: Maternal postprandial glucose levels and infant birth weight; the Diabetes in Early Pregnancy Study. *Am J Obstet Gynecol* 1991, 39: 103–111.
35. Metzger E, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Sheridan B, Hod M, Chen R, Yogeve Y, Coustan DR, Catalano PR, Giles W, Lowe G, Hadden DR, Persson B. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. The HAPO cooperative research group. *N Engl J Med* 2008, 358: 1991-2002.
36. Kerssen A, de Valk HW, Visser GH: Increased second trimester maternal glucose levels are related to extremely large-for-gestational-age infants in women with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2007, 30: 1069-74.
37. Hay LC, Wilshrust EG, Fulcher G: Unrecognized hypo and hyperglycemia in well-controlled patients with type 2 diabetes mellitus: The results of continuous glucose monitoring. *Diabetes Technology and Therapeutics* 2004, 5: 19-26.

38. Erlinger TP, Brancati FL: Postchallenge hyperglycemia in a national sample of US adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001, 24: 1734-1738.
39. Kyne-Grzebalski D, Wood L, Marshall M, Taylor R: Episodic hyperglycemia in pregnant women with well-controlled type 1 diabetes mellitus: a major potential factor underlying macrosomia. *Diabetic Med* 1999, 16: 702-706.
40. Raine CH: Self-monitored blood glucose: a common pitfall. *Endocr Pract* 2003, 9: 137-139.
41. Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, McKenzie EM: Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications. *Clin Chem* 1986, 32: B64-B70.
42. Kohnert KD, Augstein P, Heinke P, Zander E, Peterson K, Freyse EJ, Salzsieder E: Chronic hyperglycemia but not glucose variability determines HbA_{1c} levels in well-controlled patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2007, 77: 420-426.
43. Deiss D, Bolinder J, Riveline JP: Improved glycemic control in poorly controlled patients with type 1 diabetes mellitus using real-time continuous glucose monitoring. *Diabetes Care* 2006, 12: 2730-2732.
44. Yamanouchi T, Ogata N, Tagaya T: Clinical usefulness of serum 1,5-anhydroglucitol in monitoring glycaemic control. *Lancet* 1996, 347: 1514-1518.
45. Suzuki M, Kametani S, Uchida K, Akanuma H: Production of 1,5-anhydroglucitol from 1,5-anhydrofructose in erythroleukemia cells. *Eur J Biochem* 1996, 240: 23-29.
46. Kametani S, Shiga Y, Akanuma H: Hepatic production of 1,5-anhydrofructose and 1,5-anhydroglucitol in rat by the third glycogenolytic pathway. *Eur J Biochem* 1996, 242: 832-838.
47. Nowatzka W, Sarnob MJ, Birch NC, Stickle DF, Edend T, Colea TG: Evaluation of an assay for serum 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark) and determination of reference intervals on the Hitachi 917 analyzer. *Clinica Chimica Acta* 2004, 350: 201-209.

48. Yamanouchi T, Akanuma T, Nakamura T, Akoka I, Akunama Y: Reduction of plasma 1,5-anhydroglucitol (1-deoxyglucose) concentration in diabetic patients. *Diabetologia* 1988, 31: 41-45.
49. Pitkanen E: Serum 1,5-anhydroglucitol in normal subjects and in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Scand J Clin. Lab Invest* 1982, 42: 445-448.
50. Kim WJ, Park CY, Lee KB, Park ES, Rhee EJ, Lee WY, Oh EW, Park SW: Serum 1,5-anhydroglucitol concentrations are a reliable index of glycemic control in type 2 diabetes with mild and moderate renal dysfunction. *Diabetes Care* 2012, 35: 281-286.
51. Yamanouchi T, Shinohara T, Ogata N: Common reabsorption system of 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG), fructose and mannose in renal tubule. *Biochim Biophys Acta* 1996, 129: 89-95.
52. Akunama Y, Morita M, Fukuzawa N: Urinary excretion of 1,5-anhydroglucitol accompanying glucose excretion in diabetic patients. *Diabetologia* 1998, 31: 831-835.
53. Stickle D, Turk J: A kinetic bass model for 1,5-anhydroglucitol: applications to monitoring of glycemic control. *Am J Physiol* 1997, 273: E821-E830.
54. Meng X, Kawahara D, Nawa Y, Miura N, Shrestha B, Tancharoen S, Samestiva H, Hashiguchi T, Maruyama I: 1,5-Anhydro-d-fructose attenuates lipopolysaccharide-induced cytokine release via suppression of NF- κ B p65 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, 380: 343-348.
55. Meng X, Tancharoen S, Kawanare KI, Nawa Y, Tamiguchi S, Hashiguchi: 1,5-anhydroglucitol attenuates cytokine release and protects mice with type 2 diabetes from inflammatory reactions. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010, 23: 105-119.
56. Yamanouchi T, Inaue T, Ichiyanagi K, Sakai T: 1,5-AG stimulates insulin release in insulinoma cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2003, 1623: 82-87.

57. Dworacka M, Winiarska H, Szymańska M: 1,5-Anhydro-D-glucitol: a novel marker of glucose excursions. *Int J Clin Pract* 2002, 19: 40-44.
58. Kawasaki I, Sato T, Hosoi M, Yoshioka K, Yamakita T, Fukumoto M, Tanaka N, Matsuyama H, Ueda M, Fujii S: Serum 1,5-anhydroglucitol is a strong predictor of the postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes patients (Abstract). *Diabetes* 2005, 54 (Suppl. 1): 76A.
59. Akutsu T, Mori Y, Itoh Y, Tajima N: 1,5-anhydroglucitol and postprandial hyperglycemia as assessed by self-monitoring of blood glucose in Japanese patients with moderately controlled diabetes (Abstract). *Diabetes* 2007, 56 (Suppl. 1): 112A.
60. Yamanouchi T, Inoue T, Ogata E, Kashiwabara A, Ogata N, Sekino N, Yoshimura T, Ichianagi K, Kawasaki T: Post-load glucose measurements in oral glucose tolerance tests correlate well with 1,5-anhydroglucitol, an indicator of overall glycaemic state, in subjects with impaired glucose tolerance. *Clin Sci (Lond)* 2001, 101: 227–233.
61. Stettler C, Stahl M, Allemann S, Diem P, Schmidlin K: Association of 1,5-Anhydroglucitol and 2-h Postprandial Blood Glucose in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care* 2008, 31: 1534–1535.
62. Dungan K, Buse JB, Largay J, Kelly MM, Button EA, Kato S, Wittlen E: 1,5-anhydroglucitol and postprandial hyperglycemia as measured by Continuous Glucose Monitoring System in moderately controlled patients with diabetes. *Diabetes Care* 2006, 6: 1214-1219.
63. Dungan KR: 1,5-anhydroglucitol as a marker of short-term glycemic control and glycemic excursions. *Expert Rev Mol Diagn* 2008, 8: 8-19.
64. Watanabe K, Uchino H, Ohmura C, Tanaka Y, Onuma T, Kawamori R: Different effects of two alpha-glucosidase inhibitors, acarbose and voglibose, on serum 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG) level. *J Diabet Compl* 2004, 18: 183-186.

65. Klipatrick ES, Keevil BG, Richmond KL: Plasma 1,5-anhydroglucitol concentration are influenced by variations in the renal threshold for glucose. *Diabet Med.* 1999, 16: 496-49.
66. Skupien J, Gorczynska-Kosiorz S, Klupa T, Wanic K, Button EA, Sieradzki J, Malecki MT: Clinical application of 1,5-anhydroglucitol measurements in patients with hepatocyte nuclear factor-1alpha maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Care* 2008, 31: 1496-1501.
67. Pitkanen E: Occurrence of 1,5-anhydroglucitol in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 1973, 48: 159-166.
68. Yoshioka S, Saitoh S, Fujisawa T, Fujimori A, Takatani O, Funabashi M: Identification and metabolic implication of 1-deoxyglucose (1,5-anhydroglucitol) in human plasma. *Clin Chem* 1982, 28: 1283-1286.
69. Yabuuchi M, Masuda M, Katoh K, Nakamura T, Akanuma H: Simple enzymatic method for determining plasma 1,5-anhydroglucitol in plasma for determining diabetes mellitus. *Clin Chem* 1989, 35: 2039-2043.
70. Phillipou G, James SK, Fynth RG, Farrant RK, Phillips PJ: Enzymatic quantification of 1,5-Anhydro-D-Glucitol: evaluation and clinical application. *Clin Chem* 1994, 40: 1322-1326.
71. Tanaka S, Nakamari K, Akanuma H, Yabuuchi M: High performance liquid chromatographic determination of 1,5-anhydroglucitol in human plasma for diagnosis of diabetes meffitus. *Biomed Chromatogr* 1992, 6: 63-6.
72. Fukumura Y, Tajima S, Oshitani, Y, Ushijima, I, Kobayashi H, F Hara, S Yamamoto, Yabuuchi M: Fully enzymatic method for determining 1,5-anhydro-D-glucitol in serum. *Clinical Chemistry* 1994, 40: 2013-2016.
73. Nowatzkea W, Sarnob MJ, Birch NC, Stickle DF, Edend T, Colea TG: Evaluation of an assay for serum 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark) and determination of reference intervals on the Hitachi 917 analyzer. *Clinica Chim Acta* 2004, 350: 201-209.

74. Jing F, Jun L, Wang Y, Zhu M, Yong Z, Fei X, Zhang J: A novel fully enzymatic method for determining glucose and 1,5-Anhydro-D -glucitol in serum of one cuvette. *Appl Biochem Biotechnol* 2008, 150: 327-335.
75. Hamafuji T, Tsugawa W, Sode K: Clinical Application of the Serum 1,5-Anhydroglucitol Assay Method Using Glucose 3-Dehydrogenase. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2002, 16: 299–303.
76. Lequim RM: Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* 2005, 51: 2415-2418.
77. www.kamiyabiomedical.com/pdf/KT-5024.pdf.
78. Yamanouchi T, Akanuma H, Asano T, Konishi C, Akaoka I, Akanuma Y: Reduction and recovery of plasma 1,5-anhydro-D-glucitol level in diabetes mellitus. *Diabetes* 1987, 36: 709-715.
79. Yamanouchi T, Akanuma H, Nakamura T, I. Akaoka, Akanuma Y: Reduction of plasma 1,5-anhydroglucitol (1-deoxyglucose) concentration in diabetic patients. *Diabetologia* 1988, 31: 41-45.
80. M Tetsuo, T Hamada, K Yoshimatsu, J Ishimatsu, T Matsunaga: Serum levels of 1,5-anhydro-D-glucitol during the normal and diabetic pregnancy and puerperium. *Acta Obstet et Gynecol Scand* 1990, 69: 479-485.
81. Yoshioka S, Saitoh S, Fujisawa T, Fujimori A, Takatani O, Funabashi M: Identification and metabolic implication of 1-deoxyglucose (1,5- anhydroglucitol) in human plasma. *Clinical Chemistry* 1982, 28: 1283-1286.
82. Niwa T, Yamamoto N, Maeda K, Yamada K: Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of polyols in urine and serum of uremic patients: identification of new dexyalditols and inositol isomers. *J Chromatogr* 1983, 77: 25-39.

83. Pitkanen E: Mannose, Mannitol, Fructose and 1,5-anhydroglucitol concentrations measured by Gas Chromatography/Mass Spectrometry in blood plasma of diabetic patients. *Clin Chim Acta* 1996, 251: 91–103.
84. Pitkanen E, Kanninen T: Determination of Mannose and Fructose in human plasma using deuterium labelling and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Biol Mass Spectrom.* 1994, 23: 590–595.
85. Niwa T, Dewald L, Sone J, Miyazaki T, Kajita M: Quantification of serum 1,5-anhydroglucitol in uremic and diabetic patients by liquid chromatography/mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 1994, 40: 260-264.
86. Katayama M, Matsuda Y, Kobayashi K, Kaneko S, Ishikawa H: Simultaneous determination of glucose, 1,5-anhydro-D-glucitol and related sugar alcohols in serum by high-performance liquid chromatography with benzoic acid derivatization. *Biomed Chromatography* 2006, 20: 440–445.
87. Buse JB, Freeman JLR, Edelman SV: Serum 1,5-Anhydroglucitol (GlycoMark TM): A short-term Glycemic Marker. *Diabetes Technology and Therapeutics* 2003, 4: 355-363.
88. Onorato JM, Langish RA, Shipkova PA, Sanders M, Wang J, Kwagh J, Dutta S: A novel method for the determination of 1,5-anhydroglucitol, a glycemic marker, in human urine utilizing hydrophilic interaction liquid chromatography/MS(3) *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008, 873: 144-50.
89. Li S, Xiaoxiang H: Determination of glycemic monitoring marker 1,5-anhydroglucitol in plasma by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Chromatogr B*, 2008, 875: 459-464.
90. Dworacka M, Wender-Ożegowska H, Winiarska H, Borowska M, Zawiejska A, Pietryga M, Bezert J, Szczewińska K, Bobkiewicz-Kozłowska T: Plasma 1,5-anhydroglucitol (1,5-

- AG) as an indicator of hyperglycaemic excursions in pregnant women with diabetes. *Diabet Med* 2006, 23: 171-175.
91. Rosset I: Masa urodzeniowa noworodków łódzkich urodzonych o czasie. *Pediatrics Polska* 2009, 84: 151-158.
92. Yogev Y, Chen R, Ben-Haroush A, Phillip M, Jovanovic L, Hod M: Continuous glucose monitoring for the evaluation of gravid women with type 1 diabetes mellitus. *Obstet Gynecol* 2003, 101: 633– 638.
93. Kerssen A, Evers IM, Valk de HW, Visser GHA: Poor glucose control in women with type 1 diabetes mellitus and “safe” hemoglobin A1c values in the first trimester of pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003, 13: 309-313.
94. Kerssen A, Valk de H, Visser GHA: Day-to-day glucose variability during pregnancy in women with type 1 diabetes mellitus: glucose profiles measured with the continuous glucose monitoring system. *BJOG* 2004, 111: 919-924.
95. Monier L, Lapinski H, Colette C: Contributions of fasting and postprandial hyperglycemia increments to the overall diurnal hyperglycemia of type 2 diabetic patients: variations with increasing levels of HbA_{1c}. *Diabetes Care* 2003, 26: 881-885.
96. Kerssen A, De Valk HD, Visser CHA: Sibling birth weight as a predictor of macrosomia in women with T1DM. *Diabetologia* 2005, 48: 1743-1748.
97. Evers IM, de Valk HW, Mol BW, ter Braak EW, Visser GH: Macrosomia despite good glycaemic control in Type I diabetic pregnancy; results of a nationwide study in The Netherlands. *Diabetologia* 2002, 45:1484-1489.
98. Johnstone FD, Mao JH, Steel JM, Prescott RJ, Hume R: Factors affecting fetal weight distribution in women with type 1 diabetes. *Br J Obstet Gynaecol* 2000, 107: 1001–1006.
99. Taylor R, Lee C, Kyne-Grzebalski L, Marshall SM, Davison JM: Clinical outcomes of pregnancy in women with type 1 diabetes. *Obstet Gynecol* 2002, 99: 537-541.

100. Mehranz V, Khahani-Namin M, Behzad A, Rostamzadeh S: The relationship between fetal macrosomia and maternal HbA_{1c} concentration in maternal type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Endocrinologist* 2008, 18: 283-285.
101. Iciek R, Wender-Ożegowska E, Zawiejska A, Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Brażert J: Wpływ czynników metabolicznych na wzrastanie płodu u ciężarnych z cukrzycą typu 1 oraz wariantem homozygotycznym polimorfizmu 2548G/A genu leptyny. *Ginekol Pol* 2010, 81: 571-577.
102. Lapolla A, Dalfra MG, Bonomo M, Castigiolini MT, Cianni G, Mion E, Paleari R, Schievano C, Songini M, Tocco G, Volpe M, Mocsá A: Can plasma glucose and HbA_{1c} predict fetal growth in mothers with different glucose tolerance levels? *Diab Res and Clin Practice* 2007, 77: 465-470.
103. Campaigne AL, Conway DL: Detection and prevention of macrosomia. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2007, 34: 309-22.

8. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Ciąża powikłana T1DM należy do sytuacji wymagających szczególnie precyzyjnej kontroli glikemii. Cel ten jest trudny do osiągnięcia przy użyciu aktualnie stosowanych metod oceny wyrównania metabolicznego. HbA_{1c}, długoterminowy marker średniej kontroli glikemii, nie odzwierciedla krótkoterminowych zwyżek jest stężenia. Ponadto ostra hiperglikemia bywa często nieuchwytna przy użyciu konwencjonalnie wykonywanego pomiaru glukometrycznego. Stosowane metody monitorowania glikemii nie są więc wystarczające do oceny stopnia kontroli metabolicznej u matki i zapobiegania powikłaniom ciąży u kobiet z T1DM. 1,5-AG jest krótkoterminowym markerem oceny wyrównania metabolicznego w okresie 1-2 tygodni. Jego pomiar jest szczególnie przydatny do celów oceny ostrej hiperglikemii, w tym poposiłkowej. Jednakże wykazano, że poziom 1,5-AG jest uzależniony od wartości progu nerkowego dla glukozy, który w ciąży jest obniżony. Tak więc, zastosowanie tego markera do celów oceny wyrównania glikemii u ciężarnych z T1DM wymagało odrębnych badań.

Niniejsza praca doktorska dotyczy charakterystyki 1,5-AG jako markera wyrównania metabolicznego w ciąży powikłanej T1DM. Celem pracy było oznaczenie stężenia 1,5-AG u ciężarnych z T1DM oraz w grupie kontrolnej, ocena tego parametru jako markera wyrównania glikemii u pacjentek z T1DM w porównaniu z innymi metodami oceny kontroli metabolicznej, poszukiwanie związku pomiędzy stężeniem 1,5-AG u ciężarnej a masą urodzeniową noworodka i ocena przydatności oznaczania poziomu 1,5-AG jako predyktora makrosomii i LGA.

Do badania włączono 110 kobiet w ciąży powikłanej T1DM oraz 102 ciężarnych bez stwierdzonych zaburzeń gospodarki węglowodanowej. Oznaczenie 1,5-AG w obu badanych grupach wykonano metodą ELISA. U 80 kobiet z T1DM wykonano oznaczenia w każdym z trymestrów ciąży. Równocześnie oceniono poziom HbA_{1c} metodą HPLC. Dobowe profile glikemii rejestrowano za pomocą 8-punktowego pomiaru glukometrem, ponadto u 58 kobiet

wykonano zapis CGMS. U kobiet z T1DM zebrano informacje dotyczące rozpoznania, leczenia i powikłań T1DM, ciąży i danych klinicznych noworodka.

Średnie stężenie 1,5-AG u ciężarnych z T1DM wynosiło 5,1 $\mu\text{g/ml}$ (mediana: 4,5 $\mu\text{g/ml}$) i było prawie trzykrotnie niższe w porównaniu do fizjologicznej ciąży. U ciężarnych z T1DM nie stwierdzono wpływu tygodnia ciąży na poziom 1,5-AG oraz jego związek z glikemią w SMBG i CGMS. U ciężarnych z T1DM wykazano, że poziom 1,5-AG lepiej niż HbA_{1c} odzwierciedlał uzyskiwane uśrednione wartości średniej i maksymalnej glikemii mierzonej glukometrem w ciągu 7 dni poprzedzających pomiar. Ponadto stwierdzono silną, ujemną korelację stężenia 1,5-AG z parametrami glikemii w CGMS - średnią glikemią, średnią maksymalną glikemią oraz średnim AUC-140. Analiza wieloczynnikowa wykazała, że 1,5-AG jest najmocniejszym z dostępnych markerów wyrównania glikemii wskaźnikiem AUC-140, a jego stężenie najefektywniej obrazuje występowanie i nasilenie epizodów hiperglikemii. Wyniki analizy ROC wykazały, że 1,5-AG charakteryzuje zadowalająca zdolność dyskryminacyjna ($\text{AUC} > 0,8$) w wykrywaniu pacjentek z obecną PPHG powyżej 140 mg/dl oraz 120 mg/dl. U 85 kobiet z T1DM przeprowadzono ocenę zależności 1,5-AG w II i III trymestrze ciąży z masą urodzeniową noworodka. Stwierdzono, że jego średni poziom w II i III trymestrze korelował z masą urodzeniową noworodka. W modelu regresji wieloczynnikowej uwzględniającym HbA_{1c} oraz glikemię w SMBG, po standaryzacji względem wieku matki i BMI, wzrost stężenia 1,5-AG o 1 $\mu\text{g/ml}$ był związany z około 3 krotnie niższym ryzykiem LGA oraz około 5-krotnie niższym ryzykiem makrosomii. Wyniki przeprowadzonej analizy ROC sugerowały, że 1,5-AG wydaje się użytecznym klinicznie predyktorem masy urodzeniowej.

Niniejsza praca doktorska jest pierwszym badaniem dotyczącym oceny 1,5-AG w ciąży powikłanej T1DM. Badanie wykazało, że poziom 1,5-AG stanowi wartościowy wskaźnik

oceniający wyrównanie glikemii u ciężarnej z T1DM. Wykazano również po raz pierwszy związek 1,5-AG z masą urodzeniową noworodka.

9. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

Pregnancy complicated by T1DM requires a very precise monitoring of glycemic control. This target is difficult to reach with the currently used methods of glycemic control. HbA_{1c}, a long-term marker of glycemic control, does not reflect glycemic variability. Moreover, short-term hyperglycemic episodes are frequently missed by a routine daily 8-point glucose profile performed with glucose meters. Therefore, the currently used methods of glycemic assessment appear to be unreliable for the assessment of glycemic profiles in pregnancy complicated by T1DM and prevention of adverse outcomes. 1,5-AG is a novel marker of short-term glycemic control reflecting a period of the last 1-2 weeks. It is currently used as a marker of acute hyperglycemia, including PPHG. However, it has been previously shown, that 1,5-AG serum level depends on the renal glucose threshold which is decreased during pregnancy. Thus, 1,5-AG utility as a marker of glycemia in this particular group of patients warrants new studies.

This dissertation concerns the evaluation of the applicability of 1,5-AG as a marker of glycemic control in pregnancy complicated by T1DM. The specific aims included: to assess 1,5-AG concentration in pregnant women with T1DM and physiological pregnancy, to analyze the associations between 1,5-AG and other methods of metabolic control, to evaluate 1,5-AG discriminative accuracy in detecting PPHG, to search for the association between 1,5-AG and neonate birth weight, and to evaluate 1,5-AG as a biochemical predictor for LGA and macrosomia.

There were 110 pregnant women with T1DM and 102 women in physiological pregnancy included into the study. Their serum 1,5-AG was measured with an ELISA assay. In most women with T1DM 1,5-AG level was measured in each trimester of pregnancy. Subsequently, HbA_{1c} level was assessed with HPLC. The data from SMBG and CGMS were analyzed for a 1 week period before blood collection for the laboratory measurements. In 85 women, birth

weight data were collected. Characteristics involved clinical data concerning T1DM patients, pregnancy and newborns.

Mean 1,5-AG serum concentration in T1DM group was 4,5 $\mu\text{g/ml}$ which was threefold lower in comparison to physiological pregnancy. 1,5-AG was a better predictor of mean and mean maximal glycemic as measured by glucose meters than HbA_{1c} . Glycemic profiles were recorded with CGMS in 58 pregnancies. 1,5-AG correlated significantly with the glycemic indices recorded by CGMS - area under the curve at 140 mg/dl, average maximal glucose and mean glucose while HbA_{1c} correlated significantly only with mean glucose. Additionally, 1,5-AG concentration remained the strongest predictor of AUC-140 after adjusting in the multivariate model for HbA_{1c} level, indices of SMBG and week of gestation. Birth weight was collected in 84 newborns. Of these neonates 27 were classified with LGA. In 92% of pregnancies, maternal HbA_{1c} level was less than 6,1%. Mean 2nd and 3rd trimester 1,5-AG concentration was significantly lower in women with LGA in comparison with pregnancies with normal-weight newborns, and correlated significantly with birth weight. In a multivariate linear regression, 3rd trimester 1,5-AG was the strongest predictor independently associated with the newborn weight after adjusting for the possible confounders - week of birth, pre-pregnancy BMI and maternal age ($p < 1 \times 10^{-6}$), and other glycemic control assessment methods: HbA_{1c} and SMBG indices. The unadjusted risk of 1,5-AG for LGA was $\text{OR} = 0.34$ [95%CI: 0.17-0.65; $p < 10^{-4}$], the risk of macrosomia was $\text{OR} = 0.17$ [95%CI: 0.07-0.47; $p = 6 \times 10^{-4}$]. When controlled for potential confounders, these findings persisted in the multivariate logistic regression as 3rd trimester 1,5-AG appeared as a strong predictor for neonate birth weight - its 1 $\mu\text{g/ml}$ increase was associated with a threefold decrease in the risk of LGA and more than fivefold decrease of macrosomia. Additional ROC analysis revealed a sufficient AUC and high sensitivity of this marker as a clinical predictor of neonate LGA and macrosomia.

This dissertation project is the first large scale, systematic analysis of 1,5-AG performance in monitoring metabolic control in pregnancy complicated by T1DM. It was found that 1,5-AG level is an excellent biomarker of glycemic profiles in pregnancy complicated by T1DM. Additionally, its serum 3rd trimester level is a very good predictor of LGA and macrosomia. Thus, 1,5-AG clinical use should be considered in pregnancies complicated by T1DM for the assessment of glycemic control and the prediction of neonate birth weight.