

Zakład Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej
Instytut „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka”

Mgr Agnieszka Małgorzata Ochocińska

**POSZUKIWANIE POTENCJALNYCH BIOMARKERÓW
PRZEBIEGU CUKRZYCY TYPU 1 U DZIECI**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Bożena Cukrowska

Promotor pomocniczy: Dr hab. n. med. Marta Wysocka - Mincewicz

Warszawa 2023

Badania zrealizowane zostały w ramach zadania służącego rozwojowi młodych naukowców (M41/19 – *Znaczenie wybranych peptydów i białek biologicznie czynnych w przebiegu cukrzycy typu 1 u dzieci: wpływ przestrzegania i nieprzestrzegania ścisłej kontroli glikemii*; zgoda Komisji Bioetycznej przy Instytucie „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka” nr 18/KBE/2019).

Główny badacz: Mgr Agnieszka Małgorzata Ochocińska

Członkowie zespołu badawczego: Prof. dr hab. n. med. Bożena Cukrowska

Dr. hab. n. med. Marta Wysocka - Mincewicz

Podziękowania

Z całego serca dziękuję Pani promotor, **prof. dr hab. n. med. Bożenie Cukrowskiej** - za pomoc w przygotowywaniu dysertacji, cenne rady i życzliwość. Za nieustanne motywowanie, możliwość rozwoju warsztatu naukowca oraz wzór etyki pracownika naukowego.

Słowa wdzięczności kieruję również w stronę Pani **dr hab. n. med. Marty Wysockiej - Mincewicz** - promotor pomocniczej - za kliniczne spojrzenie na problem badawczy i ukierunkowanie wniosku.

Dziękuję **Dyrekcji Instytutu „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka”**, w szczególności **Dyrektorowi Instytutu - Panu dr n. med. Markowi Migdałowi**, za zaufanie, motywację, stawiane poprzeczki oraz możliwość rozwoju kompetencji.

Współautorom publikacji oraz **współpracownikom**, w szczególności pracownikom Zakładu Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej dziękuję za owocną współpracę i wsparcie w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych i statystycznych.

Niniejszą rozprawę dedykuję **śp. Prof. dr hab. n. med. Marii Goncerzewicz** – twórcy i pierwszemu Dyrektorowi Centrum Zdrowia Dziecka.

**„In medio ignis non sum aestuata”
„[stoję] pośród płomieni, ale nie płonę”**

Św. Agnieszka

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

1. Prace o charakterze artykułów poglądowych

1.1.

Ochocińska, A.; Wysocka - Mincewicz, M.; Cukrowska B. *Autoantibodies against islet cell antigens - current diagnostic possibilities/Autoprzeciwciała przeciwko antygenom komórek wysp trzustkowych – aktualne możliwości diagnostyczne*, Diagn Lab. 2022; 58 (3): 114-119.

doi: 10.5604/01.3001.0016.3189

Punktacja MNiSW: 40

2. Prace o charakterze artykułów oryginalnych

2.1.

Ochocińska, A.; Wysocka - Mincewicz, M.; Groszek, A.; Rybak, A.; Konopka, E.; Bierła, J.B.; Trojanowska, I.; Szalecki, M.; Cukrowska, B. *Could I-FABP Be an Early Marker of Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes? Retrospective Study from the Tertiary Reference Centre*. Nutrients 2022, 14, 414.

doi: 10.3390/nu14030414

Impact Factor: 6.706

Punktacja MNiSW: 140

2.2.

Ochocińska, A.; Wysocka-Mincewicz, M.; Świdzka, J.; Cukrowska, B. *Selected Serum Markers Associated with Pathogenesis and Clinical Course of Type 1 Diabetes in Pediatric Patients – The Effect of Disease Duration*. J. Clin. Med. 2023, 12, 2151.

doi: 10.3390/jcm12062151

Impact Factor: 4.964

Punktacja MNiSW: 140

Sumaryczny Impact Factor: 11.671

Sumaryczna punktacja MNiSW: 320

SPIS TREŚCI

Streszczenie w języku polskim	8
Streszczenie w języku angielskim	10
Słowa kluczowe	12
Wykaz zastosowanych skrótów.....	13
Wstęp	15
Cel rozprawy doktorskiej	21
Materiał i metody	22
Kopie opublikowanych prac	24
Omówienie wyników	55
Wnioski	59
Piśmiennictwo	60
Spis tabel i rycin	69
Zgoda Komisji Bioetycznej	71
Oświadczenia współautorów	74

Streszczenie w języku polskim

POSZUKIWANIE POTENCJALNYCH BIOMARKERÓW PRZEBIEGU CUKRZYCY TYPU 1 U DZIECI

Cukrzyca typu 1 (T1D) stanowi 10-20% wszystkich przypadków cukrzycy. Jest chorobą autoimmunizacyjną, której leczenie opiera się na insulinoterapii mającej na celu przywrócenie równowagi metabolicznej pacjenta. Aktualnie, jednym z podstawowych narzędzi diagnostycznych T1D jest ocena obecności autoprzeciwciał w surowicy krwi. Przewlekły proces autoimmunizacyjny w przebiegu choroby powoduje bezwzględny niedobór insuliny i przewlekłą hiperglikemię, której konsekwencją jest występowanie powikłań objawiających się zmianami w małych, a także dużych naczyniach (mikro- i makroangiopatie). Czynnościowe zmiany w mikrokrążeniu są odwracalne, dlatego też poszukuje się markerów do identyfikacji wczesnych stadiów zaburzeń biochemicznych wskazujących na początkowe stadia dysfunkcji śródbłonna. W patogenezie T1D podkreśla się również znaczenie zmian składu mikrobioty jelitowej, prowadzących do zaburzeń funkcjonowania bariery jelitowej i aktywacji procesów zapalnych. Ze względu na ogromny wpływ późnych powikłań na jakość życia pacjentów z T1D, ważne jest poszukiwanie wczesnych markerów uszkodzenia tkanek, które mogą wskazać na pacjentów predysponowanych do danego typu powikłań lub ich wcześniejszego rozwoju.

Główny celem rozprawy doktorskiej było poszukiwanie nowych potencjalnych wczesnych biomarkerów powikłań/zaburzeń metabolicznych u dzieci z T1D. Cel ten został zrealizowany poprzez ocenę stężeń wybranych substancji czynnych: 1) amyliny (IAPP) i jej prohormonu – proamyliny (proIAPP) – substancji wpływających na mechanizm metabolizmu węglowodanów; 2) chromograniny A (ChgA) – rzekomego autoantygeny w T1D, a także produktu jej proteolizy – katestatyny (CST); 3) jelitowego białka wiążącego kwasy tłuszczowe (I-FABP) – odpowiedzialnego za zwiększoną przepuszczalność komórek nabłonka jelitowego; 4) substancji potencjalnie ocenianych jako wskaźniki późnych powikłań: neurologicznych – czynnika wzrostu nerwów (NGF) i naczyniowych – czynnika aktywującego płytki krwi (PAF); 4) uromoduliny (UMOD) – białka wydzielanego przez komórki dystalnych kanalików nerkowych, silnie skorelowanego z eGFR, które może być związane z nefropatią cukrzycową u pacjentów z T1D. Stężenia wytypowanych substancji w grupie badanej porównano z wartościami w populacji zdrowej oraz skorelowano z czasem trwania T1D.

Badaniem objęto pacjentów chorujących na T1D, hospitalizowanych w Klinice Endokrynologii i Diabetologii Instytutu „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie oraz zdrowe dzieci bez zaburzeń gospodarki węglowodanowej w wywiadzie. Z badania

wykluczono dzieci z chorobami współistniejącymi o innych przyczynach, objawami obecnego stanu zapalnego, klinicznie istotną anemią i z oznakami hipoksji.

Wykazano, że ocena stężenia I-FABP może być wykorzystywana jako niezależny marker przepuszczalności jelitowej u pacjentów z T1D (*Ochocińska i wsp.*, *Nutrients*, 2022). Dowiedziono również, że stężenia wybranych substancji w surowicy, takich jak IAPP, proIAPP, CST, ChgA, NGF, I-FABP, PAF różnią się między pacjentami chorującymi na T1D, a osobami zdrowymi z grupy kontrolnej. Wykazano, że poziom niektórych z nich (CST, ChA, PAF i NGF) zależy od czasu trwania T1D (*Ochocińska i wsp.*, *J. Clin. Med.*, 2023).

Dodatkowo dokonano przeglądu aktualnych możliwości wykorzystania autoprzeciwciał przeciwko antygenom komórek wysp trzustkowych w przewidywaniu i diagnozowaniu T1D, co przedstawiono w pracy poglądowej (*Ochocińska i wsp.*, *Diag Lab*, 2022).

Ocena stężeń wybranych substancji dowiodła wielokierunkowego wpływu T1D na metabolizm (w tym postulowanej w literaturze uszkodzonej integralności błony jelitowej), a także wskazała na potrzebę poszukiwania biomarkerów o różnym charakterze oraz integracji wyników tych oznaczeń z informacjami klinicznymi celem wcześniejszego wykrywania dysfunkcji co umożliwiłoby wczesną, a co za tym idzie skuteczniejszą profilaktykę wtórną powikłań.

Streszczenie w języku angielskim

LOOKING FOR POTENTIAL BIOMARKERS OF TYPE 1 DIABETES IN CHILDREN

Type 1 diabetes (T1D) accounts for 10-20% of all diabetes cases. It is an autoimmune disease, the treatment of which is based on insulin therapy aimed at restoring the patient's metabolic balance. One of the basic diagnostic tools for T1D is the assessment of the presence of autoantibodies in the blood serum. The chronic autoimmune process in the course of the disease causes absolute insulin deficiency and chronic hyperglycemia, which results in the occurrence of complications manifested by changes in small and large vessels (micro- and macroangiopathies). Functional changes in microcirculation are reversible. Therefore, markers are sought to identify early stages of biochemical disorders indicating the initial stages of endothelial dysfunction. In the pathogenesis of T1D, the importance of changes in the composition of the intestinal microbiota, leading to impaired functioning of the intestinal barrier and activation of inflammatory processes, has recently been emphasized. Due to the huge impact of late complications on the quality of life of patients with T1D, it is important to search for early markers of tissue damage that may indicate patients predisposed to various types of complications or their earlier development.

The main aim of my PhD thesis was to search for new potential early biomarkers of complications/ metabolic disorders in children with T1D. This goal was achieved by assessing the concentrations of selected active substances: 1) amylin (IAPP) and its prohormone - proamylin (proIAPP) - substances affecting the mechanism of carbohydrate metabolism; 2) chromogranin A (ChgA) - a putative autoantigen in T1D, as well as a product of its proteolysis - catestatin (CST); 3) intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) – responsible for increased permeability of intestinal epithelial cells; 4) substances potentially assessed as indicators of late neurological complications - nerve growth factor (NGF) and vascular - platelet activating factor (PAF); 4) uromodulin (UMOD), a protein secreted by the cells of the distal renal tubules, strongly correlated with eGFR, which may be associated with diabetic nephropathy in T1D patients. The concentrations of the tested substances in the study group were compared with the concentrations in the healthy population and correlated with the duration of T1D.

The study included patients suffering from T1D, hospitalized at the Department of Endocrinology and Diabetology of The Children's Memorial Health Institute in Warsaw, and healthy children without a history of carbohydrate metabolism disorders. Children with other

comorbidities, signs of current inflammation, clinically significant anemia, and signs of hypoxia were excluded from the study.

It has been shown that the assessment of I-FABP concentration can be used as an independent marker of intestinal permeability in T1D patients (*Ochocińska i wsp.*, *Nutrients*, 2022). It has also been proven that the concentrations of selected substances in the serum, such as CST, ChgA, NGF, I-FABP, PAF, as well as prohormones/hormones (IAPP, proIAPP) differ between T1D patients and healthy controls. It has been shown that the level of some of them (CST, ChgA, PAF and NGF) depends on the duration of T1D (*Ochocińska i wsp.*, *J. Clin. Med.*, 2023). In addition, what was reviewed and presented in a review article (*Ochocińska i wsp.*, *Diag Lab*, 2022) the current possibilities of using autoantibodies against pancreatic islet cell antigens in the prediction and diagnosis of T1D.

The assessment of the concentrations of selected substances proved the multidirectional influence of T1D on metabolism (including the damaged integrity of the intestinal membrane postulated in the literature), and also indicated the need to search for biomarkers of a different nature and to integrate the results of these tests with clinical information in order to detect dysfunctions earlier, which would enable early and thus more effective secondary prevention of complications.

Słowa kluczowe w języku polskim i angielskim

Słowa kluczowe: amylna, autoprzeciwciała, biomarker, chromogranina A, cukrzyca typu 1, czynnik aktywacji płytek krwi, czynnik wzrostu nerwów, jelitowe białko wiążącego kwasy tłuszczowe, katestatyna, proamylna, uromodulina

Key words: amylin, autoantibodies, biomarker, catestatin, chromogranin A, nerve growth factor, platelet activating factor, proamylin, type 1 diabetes, uromodulin

Wykaz zastosowanych skrótów

anty-tTg Ab – przeciwciała przeciw transglutaminazie tkankowej

anty-GAD – autoprzeciwciała przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego

anty-IA2 – autoprzeciwciała przeciw fosfatazie tyrozynowej 2

AUC – pole pod krzywą ROC

CD – celiakia

CD4+ – białko powierzchniowe limfocytów T pomocniczych, monocytów, makrofagów i komórek dendrytycznych, o masie cząsteczkowej 55 kDa

CD8+ – białko powierzchniowe limfocytów T cytotoksycznych, komórek dendrytycznych, komórek NK oraz tzw. podwójnie dodatnich tymocytów, o masie cząsteczkowej 13,5 kDa

CD-GFD – pacjenci z celiakią stosujący dietę bezglutenową

ChgA – chromogranina A

CST – katestatyna

EliA – immunoenzymatyczny test fluorescencyjny oparty na pośrednim teście immunoenzymatycznym

ELISA – test immunoenzymatyczny

GFD – dieta bezglutenowa

eGFR – szacunkowy wskaźnik filtracji kłębuszkowej

Glut-4 – insulinozależny transporter glukozy typu 4

HbA1c – hemoglobina glikowana

HC – grupa kontrolna dzieci zdrowych (ang. Healthy Controls)

HDL cholesterol – lipoproteina o dużej gęstości

IAA – autoprzeciwciała przeciw endogennej insulinie

ICA – autoprzeciwciała przeciw niezidentyfikowanym cytoplazmatycznym komórkom β

I-FABP – jelitowe białko wiążące kwasy tłuszczowe

IAPP – amyлина

NGF – czynnik wzrostu nerwów

NOD – model zwierzęcy T1D; myszy z cukrzycą bez otyłości;

PAF – czynnik aktywujący płytki krwi

proIAPP – proamyлина

PST – pankreostatyna

PTD – Polskie Towarzystwo Diabetologiczne

ROC krzywa – narzędzie statystyczne do oceny poprawności klasyfikatora

T1D – cukrzyca typu 1

T1D-CD – pacjenci chorujący na cukrzycę typu 1 i celiakię

T1D-CD-1 – pacjenci chorujący na cukrzycę typu 1 na rok przed rozpoznaniem celiakii

T1D-CD-GFD – pacjenci chorujący na cukrzycę typu 1 i celiakię stosujący dietę bezglutenową

UMOD – uromodulina

WE-14 – naturalnie występujący produkt rozszczepiania ChgA

ZnT8 – autoprzeciwciała przeciw transporterowi cynku 8

Wstęp

Cukrzyca typu 1 (T1D) – jedna z najczęstszych chorób autoimmunizacyjnych jest chorobą przewlekłą, która wynika z indukowanego przeciwciałami niszczenia komórek β produkujących insulinę w wyspach Langerhansa w trzustce [1]. Do 2022 roku na T1D chorowało 8,75 miliona osób na całym świecie (119 995 w Polsce), z czego 1,52 miliona (15 220 w Polsce) stanowili pacjenci w wieku poniżej 20 lat [2]. Skala problemu jest zatem bardzo duża. Odkrycie, a następnie udoskonalanie insulin stosowanych w intensywnej terapii aż do ciągłego podskórnego wlewu insuliny za pomocą osobistej pompy insulinowej poprawiło opiekę nad pacjentami chorującymi na T1D przyczyniając się do znacznego wydłużenia i polepszenia jakości życia chorych. Jednak niewłaściwie leczona choroba nadal powoduje wiele powikłań, zarówno ostrych, jak i przewlekłych [3,4]. Patogeneza T1D nie została do tej pory w pełni wyjaśniona, a czynniki indukujące chorobę wciąż są przedmiotem wielu badań [5]. Postępująca utrata masy komórek β podczas rozwoju T1D ma charakter nieliniowy, ale dokładna natura i kinetyka procesów immunologicznych, które rządzą T1D, nie są znane [4,6]. Wiadomo, że w patogenezie powikłań T1D niezwykle istotne jest intensywne leczenie i bardzo dobre, stabilne wyrównanie metaboliczne od samego rozpoznania, a nie aktualny wynik glikemii [7]. Udowodniono, że poprawa wyrównania metabolicznego, na każdym etapie przebiegu T1D, wpływa na ryzyko powikłań w przyszłości, nawet po 20–30 latach trwania choroby [7]. Badacze zwracają uwagę na zjawisko zwane „pamięcią metaboliczną” będące prawdopodobnie konsekwencją wzrostu czynników stresu oksydacyjnego spowodowanego hiperglikemią, które jest częściowo nieodwracalne i utrzymuje się nawet po normalizacji glikemii [8]. Nieprawidłowe stężenia glukozy i jej metabolitów aktywują wiele niekorzystnych procesów metabolicznych (nieenzymatyczna glikacja białek, przemiany szlaków polioloowego i heksozaminowego, aktywacja kinazy białkowej C, stres oksydacyjny i niedotlenienie tkanek) [9]. Te patologiczne ścieżki prowadzą do niewydolności różnych tkanek i narządów, zwłaszcza oczu, nerek, serca, naczyń krwionośnych, komórek nerwowych. [9]. Późne powikłania w pierwszych 5 latach T1D zarówno u dzieci, jak i u dorosłych pacjentów występują sporadycznie, ale ich liczba wzrasta z czasem trwania choroby. Nie ma zgodności odnośnie kolejności występowania powikłań mikro i makroangiopatycznych [10]. Wiadomo jednak, że przed kliniczną manifestacją zmian strukturalnych w naczyniach, najpierw zachodzą zmiany funkcjonalne w mikrokrążeniu [10]. Zmiany te są odwracalne, dlatego poszukuje się wczesnych markerów do identyfikacji początkowych stadiów zaburzeń biochemicznych poprzedzających dysfunkcję śródbłonna [7,9].

Aktualnie nie ma narzędzi do diagnozowania wczesnych stadiów rozwoju późnych powikłań T1D poprzedzających pojawienie się trwałych zmian strukturalnych widocznych w badaniach obrazowych i badaniu klinicznym. Pomimo dostępności wysokowydajnych technologii „omicznych” obserwuje się niespójność danych i brak jednoznacznych, wysoce obiecujących markerów białkowych [11,12]. Poszukiwanie specyficznych biomarkerów w surowicy stanowi wyzwanie ze względu na fakt, że T1D jest wynikiem autoimmunizacyjnego ataku na komórki β , które stanowią tylko około 0,002% masa ciała [13].

Celem zapobiegania ostrym i przewlekłym powikłaniom konieczna jest ścisła kontrola glikemii tj. utrzymywanie stężenia glukozy najbliżej normy jak to możliwe, dbając równocześnie o brak jej wahań [14]. W praktyce można to osiągnąć jedynie prowadząc ciągłe monitorowanie glikemii w czasie rzeczywistym i stałe dostosowywanie dawki insuliny do zmieniającego się zapotrzebowania. Obecnie uważa się, że dla najlepszego wyrównania metabolicznego pacjenta najistotniejsze jest utrzymanie najwyższego odsetka czasu w zakresie normoglikemii, i najniższego współczynnika zmienności glikemii [15]. Te współczynniki wykorzystuje się do najrzetelniejszej codziennej oceny wyrównania metabolicznego w cukrzycy. Są one natomiast trudne do wykorzystania w badaniach oceniających oddziaływanie długiego czasu trwania cukrzycy (brak danych historycznych). W badaniach oceniających ryzyko rozwoju późnych powikłań cukrzycy nadal wykorzystuje się monitorowanie poziomu hemoglobiny glikowanej (HbA1c) odzwierciedlającej średnie stężenie glukozy z okresu około trzech miesięcy. Wykazano, że stężenie HbA1c jest bezpośrednio związane z przeżyciem pacjentów z około 30-letnią historią T1D [16]. Wiadomo jednak, że HbA1c nie jest idealnym wskaźnikiem wyrównania metabolicznego [17]. Przede wszystkim nie uwzględnia dobowej zmienności i wahań glikemii, które mają negatywny wpływ na czynność mikrokrążenia i w konsekwencji występowanie powikłań. Nie jest to narzędzie pozwalające na rozpoznanie wczesnych stadiów rozwoju zaburzeń o charakterze zmian czynnościowych (zwykle odwracalnych) poprzedzających powstanie trwałych zmian strukturalnych [17–20]. Pozostaje również pytanie, czy paradygmat glukocentryczny, uznający hiperglikemię za główny czynnik rozwoju T1D, jest rzeczywiście słuszny. Sugeruje się, że istnieją inne, dotychczas nierozpoznane cele terapeutyczne, którymi należy się kierować w leczeniu T1D [21].

Aktualnie wykorzystywanymi w praktyce klinicznej specyficznymi biomarkerami T1D, które odróżniają T1D od innych podtypów cukrzycy są: niski poziom peptydu C oraz autoprzeciwciała skierowane przeciw antygenom komórek wysp trzustkowych [22,23]. W wyniku cytotoksycznego oddziaływania makrofagów i limfocytów T z antygenami komórek

β dochodzi do uszkodzenia wysp i uwolnienia antygenów wewnątrzkomórkowych. Brak tolerancji na własne białka wyspowe, homologia w ich budowie z sekwencjami niektórych wirusów oraz generowanie reakcji krzyżowych powoduje zaangażowanie układu immunologicznego i produkcję autooprzeciwciał. Ich pojawienie się poprzedza wystąpienie T1D o miesiące, a nawet lata. Stopień zniszczenia wysp może odzwierciedlać rodzaj pojawiających się przeciwciał, ich podtypy i izotypy oraz specyficzność względem epitopów antygeny [23]. Zgodnie z najnowszymi wytycznymi Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (PTD) T1D jest definiowana przez obecność dwóch lub więcej autooprzeciwciał [24]. Zaleca się oznaczanie wszystkich czterech autooprzeciwciał skierowanych przeciw swoistym antygenom komórek β wysp (anty-GAD, anty-IA2, ZnT8 oraz IAA) w celu dokładnego rozpoznania choroby i maksymalizacji czułości wykrywania T1D. Zgodnie z wytycznymi PTD oznaczenie autooprzeciwciał przeciwko antygenom komórek wysp trzustkowych wykonuje się w przypadku pierwotnego rozpoznania hiperglikemii lub rewizji rozpoznania jak również u osób z dużym ryzykiem zachorowania na T1D [23,24]. Obecność wysokiego miana jednego z przeciwciał lub podwyższonego miana dwóch przeciwciał świadczy o aktywnym autoimmunizacyjnym procesie apoptozy komórek β trzustki i pozwala na rozpoznanie T1D I stopnia (fazy przedklinicznej) [22]¹.

Istnieje jednak grupa pacjentów, u których w chwili rozpoznania nie obserwuje się występowania autooprzeciwciał i/lub pomimo intensywnej insulinoterapii nie uzyskuje się wyrównania metabolicznego [25,26]. Być może sytuacja ta jest uwarunkowana innymi czynnikami determinującymi manifestację kliniczną w późniejszym okresie choroby. Szczególną uwagę zwrócono na rolę dotychczas nie do końca poznanego mechanizmu modyfikacji epigenetycznych indukowanych hiperglikemią i glutotoksycznością [27]. Sugeruje się, że modyfikacje epigenetyczne (niezwiązane z samą sekwencją DNA, ale z chemiczną modyfikacją materiału jądrowego: DNA i chromatyny) z udziałem określonych enzymów stanowią związek między rozwojem T1D i jej powikłań, a czynnikami środowiskowymi i predyspozycją genetyczną [28,29].

Według naszej najlepszej wiedzy nikt wcześniej nie analizował zmian stężeń amyliny (IAPP), proamyliny (proIAPP), katestatyny (CST), chromograniny A (ChgA), czynnika wzrostu nerwów (NGF), czynnika aktywującego płytki krwi (PAF) i uromoduliny (UMOD) w kontekście czasu trwania T1D. Jednak w wielu badaniach substancje te wskazywano jako przyczyniające się do etiologii T1D – IAPP, proIAPP [30–38], jej przebiegu – CST, ChgA [39–43] czy rozwoju różnych powikłań cukrzycowych, w tym: neuropatii – NGF [44–46], powikłań

¹ Szczegółowy opis możliwości diagnostycznych autooprzeciwciał skierowanych przeciw antygenom wysp trzustkowych opisano w formie pracy o charakterze poglądowym (*Ochocińska i wsp.*, Diagn Lab. 2022)

sercowo-naczyniowych – PAF [47–49], czy powikłań sercowo-naczyniowych i nefropatii – UMOD [50–52] u pacjentów z T1D.

IAPP – wytwarzana przez komórki β wysypek Langerhansa w trzustce jest wydzielana do krwioobiegu w odpowiedzi na wzrost stężenia glukozy we krwi, równoległe z insuliną [53]. Działa nie tylko na specyficzne receptory zlokalizowane na komórkach β trzustki, ale również komórkach ośrodkowego układu nerwowego, mięśniach, korze nerki. Ze względu na blokowanie neuronów w okolicy pola najdalszego mózgowia nazywana jest „hormonem anorektycznym” [54]. Cząsteczki amyliny agregują w komórkach β i tworzą nierozpuszczalny złóg amyloidu, bardzo cytotoksyczny dla komórek β , ale także dla innych komórek ciała człowieka. Warto podkreślić, że insulina mimo, że również agreguje, nie jest cytotoksyczna, gdyż jest łatwo glikolowana przez D-rybozę [33,55]. IAPP hamuje przyjmowanie pokarmu (apetyt), opróżnianie żołądka (przechodzenie pokarmu z żołądka do jelit) oraz obniża stężenie glukozy [35,56]. Liczne badania nad powstawaniem amyloidu doprowadziły do możliwości syntezy syntetycznego analogu ludzkiej IAPP – pramlintydu [57,58]. Rozpuszczalne analogi IAPP, które nie tworzą agregatów, są obecnie stosowane w niektórych krajach w leczeniu cukrzycy razem z insuliną [59–62]. Nie wszystkie biologiczne interakcje IAPP zostały odkryte. Przy niskich stężeniach glukozy IAPP wzmacnia, a przy wysokich hamuje proliferację komórek β . Hamuje poposiłkowe wydzielanie glukagonu, ale nie hamuje wydzielania glukagonu podczas hipoglikemii indukowanej insuliną. Udział IAPP i jej oligomerów w przebiegu cukrzycy typu 2 jest dość dobrze udokumentowany [33,63]. Coraz więcej doniesień wskazuje również na stosowanie pramlintydu u nastoletnich pacjentów z T1D [59,64,65].

ProIAPP jest cząsteczką prekursorową dla IAPP. Upośledzenie przetwarzania proIAPP może występować w stanach dysfunkcji komórek β . To, czy poziomy prekursorów IAPP są podwyższone w okresie przed rozpoznaniem T1D, jak wcześniej zgłaszano dla proinsuliny, i czy może to mieć wartość prognostyczną, nie zostało jeszcze określone [37,66]. Stosunek proIAPP do dojrzałej IAPP, który jest około trzykrotnie wyższy u pacjentów z T1D niż u osób zdrowych, może sugerować, że osoby te mają głębokie defekty w przetwarzaniu proIAPP [37]. Postulowano, że przekształcanie proIAPP pośredniczy w tworzeniu złogów amyloidu *in vivo*. Depozyty mogą zawierać prekursory IAPP proIAPP 1-67 i proIAPP 1-48 [67,68]. Pomiar proIAPP w krążeniu może odzwierciedlać postęp amyloidogenezy na poziomie wysp trzustkowych. Nie jest jednak jasne, czy zmiany przekształcania tych prohormonów są przyczyną, czy tylko konsekwencją zaburzeń metabolicznych w T1D [36].

CST, jako produkt hydrolizy ChgA, jest wielofunkcyjnym regulatorem wielu procesów fizjologicznych, takich jak uwalnianie katecholamin, aktywacja układu współczulnego,

metabolizm tłuszczów, aktywacja baroreceptorów, migracja neutrofilii, monocytów i komórek tucznych [69–71]. Wykazano, że w T1D oraz innych stanach patologicznych transport glukozy do mięśnia sercowego może być zaburzony, a brak insuliny powoduje niewystarczającą aktywność transportera glukozy typu 4 (GluT-4). W doświadczeniach na zwierzętach wykazano, że podawanie CTS istotnie zwiększało aktywność GluT-4, w sposób kompensujący niedobór insuliny [72]. Rola CTS w T1D nie jest dobrze poznana. Nie wiadomo, jak zmienia się stężenie CST wraz z czasem trwania choroby i przestrzeganiem normoglikemii.

ChgA jest znanym markerem guzów neuroendokrynych [73]. Jej synteza zachodzi w komórkach neuroendokrynych i endokrynych, w tym w komórkach α i β trzustki [74]. Najważniejszą funkcją natywnej ChgA jest segregacja i transport różnych białek do pęcherzyków wydzielniczych. ChgA ulega proteolizie zarówno w cytoplazmie, jak i w przestrzeni międzykomórkowej. Produktami tej proteolizy są m.in. CST, pankreostatyna (PST) i peptyd WE-14, które działają parakrynnie, autokrynnie i endokrynnie [75]. PST i CST mają wpływ na działanie insuliny i ogólny metabolizm węglowodanów. WE-14 jest silnym autoantygenem dla klonów komórek T linii CD4+ i CD8+, które indukują apoptozę komórek β . Właściwości autoantygenowe WE-14 są znacznie wzmacniane przez działanie transglutaminazy tkankowej, która ma zdolność modyfikowania tego peptydu [76]. Badania przekrojowe wykazały wyższe poziomy ChgA, PST i WE-14 u pacjentów z cukrzycą [42,43,76]. Dynamika zmian stężeń tych substancji w przebiegu T1D (np. w kontekście czasu trwania choroby czy wyrównania metabolicznego) jest nieznana. Najbardziej intrygującym odkryciem jest to, że T1D nie rozwija się u myszy z cukrzycą bez otyłości (NOD) pozbawionych genu ChgA [77,78].

NGF jest cząsteczką sygnalizacyjną zaangażowaną w tworzenie i dojrzewanie synaptyczne. Reguluje wzrost neuronów i tworzenie aksonów w całym układzie nerwowym [79]. Badania przekrojowe wykazały znacząco niski poziom NGF we krwi pacjentów z cukrzycą typu 2, zwłaszcza tych z zaawansowaną neuropatią [45,46]. Podejmowano również próby dotyczące wykorzystania NGF w leczeniu cukrzycy, w których wykazano korzystne oddziaływanie NGF u pacjentów z neuropatią. Mechanizm działania ochronnego polegał na złagodzeniu stresu oksydacyjnego wywołanego hiperglikemią, który inicjuje i sprzyja rozwojowi neuropatii cukrzycowej [80]. Nie wiadomo natomiast, czy NGF może być markerem ryzyka i przebiegu neuropatii u dzieci z T1D.

PAF produkowany zarówno w komórkach krwi, jak i w narządach i tkankach obwodowych (miocyty, komórki śródbłonna, komórki śródmiąższowe i mezangialne nerek) prawdopodobnie odgrywa znaczącą rolę w patogenezie T1D. Wywiera silny wpływ na wiele komórek [81,82] regulując m.in. reakcje zapalne i nadwrażliwość [83]. Wykazano, że stężenie

PAF we krwi pacjentów z T1D jest najwyższe u osób ze świeżo rozpoznaną chorobą. Nie stwierdzono różnic w stężeniu PAF u dzieci chorujących od 3 miesięcy do 5 lat oraz tych, które chorowały powyżej 5 lat. We wszystkich grupach stężenie PAF było istotnie wyższe niż u dzieci zdrowych [49]. Uważa się, że zwiększone stężenie PAF wiąże się z rozwojem powikłań mikro- i makronaczyniowych [48,84] jednak obserwacje u dzieci z T1D wymagają potwierdzenia.

UMOD jest białkiem wydzielanym przez komórki dystalnych kanalików nerkowych. Występuje zarówno w moczu, jak i we krwi. Jest to najobficiej występujące białko w moczu ludzi zdrowych. Jest głównym składnikiem wałeczków szklistych w osadzie moczu. Tworzy żel przy niskim pH. Uważa się, że dzięki tej właściwości reguluje gospodarkę wodno-elektrolitową w pętli Henlego. Ma również silne właściwości antybakteryjne i przeciwzapalne [85]. Wraz z zaburzeniami czynności nerek zwiększa się stężenie uromoduliny w moczu i maleje w surowicy krwi. Stężenie tego białka w surowicy osób zdrowych wynosi średnio 200 ng/ml i silnie koreluje z eGFR. Związek między stężeniem uromoduliny a nefropatią cukrzycową u pacjentów z T1D jest przedmiotem ostatnich badań [51].

I-FABP jest rozpuszczalnym w wodzie białkiem o niskiej masie cząsteczkowej (14–15 kDa) należącym do rodziny białek wiążących kwasy tłuszczowe [86]. Białko to ulega ekspresji w komórkach nabłonkowych błony śluzowej jelita cienkiego, a w przypadku uszkodzenia nabłonka obserwuje się jego zwiększone stężenie we krwi [87,88]. Ocena stężenia I-FABP jest postulowana jako dodatkowy biomarker rozpoznania i monitorowania CD. CD jest jedną z najczęstszych chorób współistniejących z T1D. Średnio od 2 do 16% pacjentów z T1D choruje jednocześnie na CD, przy czym u zdecydowanej większości chorych CD rozwija się w ciągu pierwszych 5 lat trwania T1D [89]. Chociaż badania przesiewowe w kierunku celiakii obejmujące ocenę swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko transglutaminazie tkankowej (anty-tTg Ab) obecnie są zalecane zarówno przez ekspertów w zakresie gastroenterologii dziecięcej [90,91], jak i diabetologów [92] poszukuje się jednak wczesnych markerów celiakii, które umożliwiłyby wprowadzenie diety bezglutenowej celem zahamowania procesów autoimmunizacyjnych indukowanych glutenem. I-FABP wydaje się dobrym kandydatem, jednak brak jest badań w tym zakresie.

Cel rozprawy doktorskiej

Główny celem rozprawy doktorskiej było poszukiwanie potencjalnych wczesnych biomarkerów zaburzeń metabolizmu w T1D u dzieci.

Cele szczegółowe:

W publikacji: *Could I-FABP Be an Early Marker of Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes? Retrospective Study from the Tertiary Reference Centre* (Ochocińska i wsp., Nutrients, 2022) oceniano, czy jelitowe białko I-FABP może być wczesnym markerem celiakii (CD) - choroby autoimmunizacyjnej o wspólnej patogenezie genetycznej z T1D, w której potwierdzono upośledzoną funkcję bariery śluzówkowej.

Celem pracy *Selected Serum Markers Associated with Pathogenesis and Clinical Course of Type 1 Diabetes in Pediatric Patients – The Effect of Disease Duration* (Ochocińska i wsp., J. Clin. Med., 2023) była ocena stężeń wybranych substancji czynnych (IAPP, proIAPP, CST, ChgA, I-FABP, NGF, PAF, oraz UMOD), których udział w patogenezie i przebiegu T1D oraz jej powikłań jest znany lub postulowany oraz skorelowanie stężeń tych wskaźników z czasem trwania T1D, jak również porównanie ze stężeniami u osób zdrowych.

Material i Metody

Pacjenci

Badaniem objęto pacjentów chorujących na T1D, hospitalizowanych w Klinice Endokrynologii i Diabetologii Instytutu „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie oraz zdrowe dzieci bez rozpoznania T1D w wywiadzie. Z badania wykluczono dzieci z chorobami współistniejącymi o innych przyczynach, objawami obecnego stanu zapalnego, klinicznie istotną anemią i z oznakami hipoksji.

Publikacja *Could I-FABP Be an Early Marker of Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes? Retrospective Study from the Tertiary Reference Centre* (Ochocińska i wsp., *Nutrients*, 2022) dotyczy badania przeprowadzonego u 156 pacjentów z T1D, 51 pacjentów z T1D i aktywną postacią CD (T1D-CD) oraz 38 pacjentów z aktywną CD bez T1D, którzy zostali losowo wybrani spośród pacjentów hospitalizowanych. Unikatową grupę stanowiło 22 pacjentów z T1D, z ujemnymi markerami serologicznymi CD w chwili rozpoznania, u których dzięki corocznemu przesiewowi zdiagnozowano CD. Ponadto wśród pacjentów (T1D-CD) oraz u pacjentów z aktywną CD wyodrębniono podgrupę pacjentów, którzy stosowali GFD przez co najmniej 6 miesięcy (36 osób z CD-GFD i 39 osób z T1D-CD-GFD).

Do badania włączono również 55 dzieci bez rozpoznania T1D, chorób współistniejących o innych przyczynach, objawów obecnego stanu zapalnego, klinicznie istotnej anemii i oznak hipoksji stanowiących zdrową grupę kontrolną (HC).²

Publikacja *Selected Serum Markers Associated with Pathogenesis and Clinical Course of Type 1 Diabetes in Pediatric Patients – The Effect of Disease Duration* (Ochocińska i wsp., *J. Clin. Med.*, 2023) odnosi się do badania przeprowadzonego w grupie 156 pacjentów z T1D. Do tego badania włączono również 55 dzieci bez rozpoznania T1D, stanowiących HC. Z grupy pacjentów z T1D wyodrębniono 30 dzieci z nowo rozpoznaną T1D oraz 126 pacjentów z T1D trwającą ponad 3 lata. Pacjentów długo chorujących (>3 lat) podzielono dodatkowo według czasu, jaki upłynął od rozpoznania T1D wyodrębniając tych bez spodziewanych powikłań (pierwsze 3–5 lat choroby), pacjentów z prawdopodobieństwem wykrycia pierwszych wczesnych biochemicznych markerów powikłań (6–7 lat choroby) oraz pacjentów, u których subkliniczne powikłania mogłyby być wykryte (>7 lat choroby). Żaden z pacjentów

² Szczegółową charakterystykę grupy badanej zawarto na str. 33 w Tab. 1 publikacji *Ochocińska i wsp.*, *Nutrients*, 2022

włączonych do badania nie miał powikłań w postaci neuropatii, nadciśnienia ani retinopatii w dniu wykonania analizy biochemicznej.³

Metody

Wszystkie substancje czynne oceniono za pomocą testów immunoenzymatycznych ELISA (IAPP, proIAPP, NGF, ChgA, PAF — Cloud Clone Corp, Katy, USA; CTS — RayBio, Norcross, Stany Zjednoczone; UMOD — BioVendor, Brno, Czechy; I-FABP — Hycult Biotech Inc., Wayne, Stany Zjednoczone) zgodnie z instrukcjami producentów testów.

Badania biochemiczne, m.in. HbA1c oceniano rutynowymi metodami laboratoryjnymi na analizatorze Alinity ci-series firmy Abbott w Laboratorium Badań Podstawowych Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”.

Badania serologiczne niezbędne do diagnostyki T1D i CD wykonano w Zakładzie Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej (anty-GAD, anty-IA2, ICA) oraz Zakładzie Patomorfologii (anty-tTg Ab). Autoprzeciwciała anty-GAD i anty-IA2 oceniano metodami radioimmunologicznymi (Medipan GmbH, Dahlewitz, Niemcy), ICA metodą immunoenzymatyczną ELISA (Medipan GmbH, Dahlewitz, Niemcy), anty-tTg Ab testem EliA na analizatorze Phadia100 firmy Thermo Scientific.

Analiza statystyczna

Minimalną wymaganą wielkość próby oszacowano na 86 uczestników za pomocą oprogramowania Epi Info TM 7 dostępnego na stronie <https://www.cdc.gov/epiinfo/index.html> . Dane analizowano przy użyciu oprogramowania Statistica v.10.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).⁴

³ Szczegółową charakterystykę grupy badanej, w tym status biochemiczny (Tab.1.) zawarto na str. 42 w podrozdziale Material and Methods publikacji *Ochocińska i wsp.*, J. Clin. Med., 2023

⁴ Zastosowane narzędzia statystyczne opisano na str. 33 (*Ochocińska i wsp.*, Nutrients, 2022) oraz str. 43 (*Ochocińska i wsp.*, J. Clin. Med., 2023).

Kopie opublikowanych prac

Ochocińska, A.; Wysocka - Mincewicz, M.; Cukrowska B. *Autoantibodies against islet cell antigens - current diagnostic possibilities/ Autoprzeciwciała przeciwko antygenom komórek wysp trzustkowych – aktualne możliwości diagnostyczne*, Diagn Lab. 2022; 58 (3): 114-119.

Ochocińska, A.; Wysocka - Mincewicz, M.; Groszek, A.; Rybak, A.; Konopka, E.; Bierła, J.B.; Trojanowska, I.; Szalecki, M.; Cukrowska, B. *Could I-FABP Be an Early Marker of Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes? Retrospective Study from the Tertiary Reference Centre*. Nutrients 2022, 14, 414.

doi: 10.3390/nu14030414

Ochocińska, A.; Wysocka - Mincewicz, M.; Świdorska, J.; Cukrowska, B. *Selected Serum Markers Associated with Pathogenesis and Clinical Course of Type 1 Diabetes in Pediatric Patients – The Effect of Disease Duration*. J. Clin. Med. 2023, 12, 2151.

doi: 10.3390/jcm12062151

Autoantibodies against islet cell antigens: Current diagnostic possibilities

Autoprzeciwciała przeciwko antygenom komórek wysp trzustkowych – aktualne możliwości diagnostyczne

Agnieszka Ochocińska¹ (ORCID: 0000-0002-6997-6197), Marta Wysocka-Mincewicz², Bożena Cukrowska³

¹Department of Biochemistry, Radioimmunology and Experimental Medicine, The Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland

²Department of Endocrinology and Diabetology, The Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland

³Department of Pathomorphology, The Children's Memorial Health Institute, Warsaw, Poland

Abstract

In the pathogenesis of type 1 diabetes (T1D) the causative process is the immunological destruction of pancreatic beta cells (β -cells) by autoreactive cytotoxic lymphocytes and macrophages. These changes are reflected in the blood of patients as autoantibodies directed against β -cell antigens. Antibodies against the following are measured: unidentified cytoplasmic β -cells (ICA), glutamic acid decarboxylase (GAD), tyrosine phosphatase (IA-2), endogenous insulin (IAA) and zinc transporter 8 (ZnT8). The complete destruction of pancreatic beta cells stops the production of autoantibodies. It is therefore believed that the determination of antibodies associated with T1D is of major importance in the early stages of the disease. The IAA test must be performed prior to initiating insulin therapy. As in the case of ICA, GADA and IA-2A, a positive IAA result in a patient who is not taking insulin confirms the presence of T1D. The latest in T1D diagnostics is ZnT8, an ideal complement to the current tests. About 25-30% of patients who do not have GAD, IA2A or ICA antibodies have ZnT8 antibodies. Moreover, in some clinical cases of T1D with negative specific antibodies, the isolated presence of ICA is observed, which indicates other, hitherto unknown antigens. Along with routine antibody measurements, optimising sampling and test development in terms of reliability and cost-effectiveness continues. This summary describes the present utility and future prospects for T1D prediction and diagnosis using the measurement of autoantibodies.

Keywords: autoantibodies, GAD, IA-2, IAA, ICA, T1D, ZnT8

Streszczenie

Przyczyną cukrzycy typu 1 (T1D) jest immunologiczne zniszczenie komórek beta trzustki (komórki β) przez autoreaktywne cytotoksyczne limfocyty i makrofagi. Zmiany te znajdują odzwierciedlenie we krwi pacjentów jako obecność autoprzeciwciał skierowanych przeciwko antygenom komórek β . Mierzone są następujące przeciwciała: przeciwko niezidentyfikowanym cytoplazmatycznym komórkom β (ICA), przeciwko dekarboksylazie kwasu glutaminowego (GAD), przeciwko fosfatazie tyrozynowej (IA-2), przeciwko endogennej insulinie (IAA) i przeciwko transporterowi cynku 8 (ZnT8). Całkowite zniszczenie komórek beta trzustki zatrzymuje produkcję autoprzeciwciał. Uważa się zatem, że oznaczenie przeciwciał związanych z cukrzycą typu 1 ma duże znaczenie we wczesnych stadiach choroby. Test IAA należy wykonać przed rozpoczęciem insulinoterapii. Podobnie jak w przypadku ICA, GADA i IA-2A dodatni wynik IAA u pacjenta nieprzyjmującego preparatów insuliny potwierdza obecność cukrzycy typu 1. Najnowsze w diagnostyce T1D są autoprzeciwciała ZnT8, które są idealnym uzupełnieniem dotychczasowej diagnostyki. Około 25-30% pacjentów, którzy nie mają przeciwciał GAD, IA2A i ICA, ma przeciwciała ZnT8. Ponadto w niektórych przypadkach klinicznych T1D z ujemnymi przeciwciałami swoistymi obserwuje się izolowaną dodatnią obecność ICA, co wskazuje na inne, dotychczas nieznanne antygeny. Wraz z rutynowymi pomiarami przeciwciał kontynuowana jest optymalizacja pobierania próbek i opracowywania testów, aby były czułe, specyficzne, a zarazem tanie. Niniejsze podsumowanie opisuje obecną użyteczność i przyszłe perspektywy przewidywania i diagnozowania T1D przy użyciu pomiaru autoprzeciwciał.

Słowa kluczowe: autoprzeciwciała, GAD, IA2, IAA, ICA, T1D, ZnT8

Received: 02.08.2022

Accepted: 11.10.2022

Published: 16.12.2022

DOI: 10.5604/01.3001.0016.3189

Corresponding author:

Agnieszka Ochocińska, Department of Biochemistry, Radioimmunology and Experimental Medicine, The Children's Memorial Health Institute, 04-730 Warsaw, Al. Dzieci Polskich 20, e-mail: a.ochocinska@wp.pl

Cite the article as:

Ochocińska A, Wysocka-Mincewicz M, Cukrowska B. Autoantibodies against islet cell antigens: Current diagnostic possibilities. *Diagn Lab.* 2022; 58 (3): 114-119



Open access

The content of the journal is available in Open Access formula which means free access to scientific data for researchers and readers.



Copyright

This material is available under the Creative Commons – Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0). The full terms of this license are available on: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

License

Some right reserved. Polish Society of Laboratory Diagnostics. Published by Index Copernicus Sp. z o.o.

Conflict of interests

The authors declare that they have no competing interests.

INTRODUCTION

In 2022, there were 8.75 million individuals worldwide with type 1 diabetes mellitus (T1D) (119,995 in Poland); 1.52 million of them were younger than 20 years (15,220 in Poland). One in five (1.9 million) lived in low-income and lower-middle-income countries. Looking at worldwide data, 530,000 new cases of T1D were diagnosed across all ages, including 201,000 patients under the age of 20. So the scale of the problem is very large [1].

T1D is a chronic disease that results from the autoimmune destruction of insulin-producing β -cells in the islets of Langerhans in the pancreas. Childhood onset is most often acute with a rapid increase in symptoms. Typical symptoms include increased thirst, polyuria, weight loss despite excessive appetite and weakness. In some cases, there may be remission. Ketoacidosis – the uncontrolled production of ketone bodies that cause a metabolic acidosis which results in a blood pH value below 7.35 – and ketonuria (30%), severe hyperglycaemia (90%) and – in extreme cases, coma – are common. Symptoms become clinically apparent only after the β -cell mass has been severely damaged (approximately 90%), reducing the body's ability to maintain glycaemic control and metabolic function. Since prevention and therapy strategies are aimed at a return to normoglycaemia, it becomes necessary to have methods to monitor this process. Although lifelong exogenous insulin administration may help to some extent in balancing glucose homeostasis in T1D patients, there are currently no effective therapies for the disease. If left untreated, the disease leads to death [2].

The diagnostics of T1D includes a thorough history and assessment of glucose levels (plasma glucose and HbA1c), as well as ketosis detection. The measurement of certain antibodies – anti-glutamic acid decarboxylase (GAD), anti-tyrosine phosphatase (IA-2), cytoplasmic and surface anti-islet antibodies (ICA), anti-zinc transporter antibodies (ZnT8) and anti-insulin antibodies (IAA) – is not recommended for a T1D diagnosis, but is used for differential diagnosis. In some cases it is also necessary to determine the concentration of C-peptide and the human leukocyte antigen (HLA) genotype [3, 4]. In the Caucasian population, genetic predisposition is determined by specific combinations of the DR and DQ alleles of the HLA genes, indicating higher or lower risk [5]. The highest risk haplotypes are DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 and DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02 (also referred to by previous serology as DR3/DR4 or DQ2/DQ8). The protective haplotypes for T1D are DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02, DRB1*14:01-DQA1*01:01-DQB1*05:03 and DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*03:03 [6]. Performing genetic testing shortly after birth can estimate the risk of developing diabetes and can identify people at a higher risk of developing T1D. People with genetic or immunological markers of T1D detected in screening should be given access to appropriate counselling and information [7].

So far, no reports have been published on the relationship between a specific genetic background and the presence of selected autoantibodies. The presence of autoantibodies to only one of the four

antigen groups is associated with only a marginal increase in risk, while the risk is markedly higher when islet autoantibodies to two or more of the antigen groups are found. T1D risk can vary in relation to which of the islet autoantibodies is present. In particular, the presence of antibodies to IA-2 is associated with highest risk. Similar to the number of islet autoantibodies, greater titre, affinity and broadness of epitope reactivity are features of islet autoantibodies that are associated with high T1D risk [8].

The same antibodies as in children and adolescents with T1D are detected in people with latent autoimmune diabetes in adults (LADA). Therefore, the current classification of diabetes does not differentiate LADA diabetes, which is considered one of the clinical forms of T1D [9].

ANTIBODIES AGAINST BETA-CELL ANTIGENS

Antibodies to pancreatic islet antigens are strongly associated with the development of T1D. As a result of the cytotoxic interaction of macrophages and T lymphocytes with β -cell antigens, the islets are damaged and intracellular antigens are released. A lack of tolerance to the body's own islet proteins, homology in their structure with the sequences of certain viruses and the generation of cross-reactions leads to the immune system's involvement and the production of autoantibodies. It is hypothesised that the loss of tolerance to a key antigen may induce an immune response against other β -cell antigens of the pancreatic islets [3]. Thus, the appearance of antibodies directed to one or more autoantigens indicates the presence of an autoimmune process that destroys β -cells. The degree of islet destruction may be reflected by the type of antibodies that appear, their subtypes and isotypes and their specificity for antigen epitopes [10, 11]. Understanding the factor that initiates an autoimmune reaction is therefore important in understanding the mechanism of the disease and trying to intervene in its course. Islet antibodies are detectable many years before the onset of the first disorders of glucose metabolism or abnormal responses to glucose loading tests, making them an extremely valuable and diagnostically available indicator of the autoimmune process in the pancreas [2, 12].

Anti-islet antibodies

Islet antibodies are the primary and best known indicator of the humoral response. They were described for the first time by Bottazzo in 1974 in a polyendocrine syndrome, including T1D [13], thus confirming the autoimmune nature of the disease.

Anti-islet antibodies are a heterogeneous group of G-class immunoglobulins [14], some of which have the ability to fix complement [15]. The group of anti-islet antibodies includes all antibodies directed against the pancreatic islet antigens GAD, IA-2, ICA69 and ZnT8, as well as those not yet discovered [16, 17].

Over the years, ICA has been measured by indirect immunofluorescence using the human pancreas as the source of all antigens.



Two types of fluorescence are observed in microscopic imagery: restrictive, ICA binding to antigens on the periphery of the islet, and non-restrictive, ICA binding to all antigens of islet cells and visible as homologous fluorescence. In order to standardise the methodology of ICA determinations and the technique of evaluation, attempts have been made to harmonise the ICA detection method. The international unit JDF (Juvenile Diabetes Foundation) was created to express the quantitative value of the antibodies present. Modifications to the methodology for determining anti-islet antibodies made the test a sensitive and specific marker of T1D [18, 19].

Islet autoantibody assays have improved significantly over the past two decades and "biochemical" autoantibodies are measured for most purposes, while the ICA cytoplasmic assay remains important for specialised research and for specific research groups. The islet cell antibody immunofluorescence test is still used in some centres, but should be replaced as it is operator-dependent and nonspecific, detecting interspecies antigen-antibody binding. The international antibody standardisation programme also provided data indicating that the immunofluorescence technique is not sensitive enough to detect positive antibody results [20-22].

Although the clinical practice guidelines suggest but do not recommend antibody testing in high-risk individuals in order to detect preclinical T1D, biochemical detection of ICA is sometimes still used. The test is most useful in the context of analysing populations where the expected frequency of positive results is low, such as screening in women with gestational diabetes or testing in patients clinically classified with type 2 diabetes for specific autoantibodies indicative of LADA. In this case, the test should be treated as supporting the differential diagnosis. Measuring undefined autoantibodies against islet cell antigens is less useful in a population where the expected frequency of positive outcomes is high, such as children with newly diagnosed T1D [23]. As a consequence, clinical laboratories are using ICA less and less in routine diagnostic tests (determined both by immunofluorescence and biochemical measurements). At the time of T1D diagnosis, antibodies are found in about 70-80% of patients [24, 25]. During the course of the disease, the ICA reaction is gradually suppressed, which is likely related to the progressive destruction of β -cells [26, 27]. Many years of observations have shown the presence of ICA even in the 10th year of clinical disease in one third of children [28]. Moreover, among family members of children with T1D, ICA is found in 3-5%, whereas in the general population anti-islet antibodies are found with a frequency of 0.1-0.3% [29]. ICA is also detected in other autoimmune diseases, such as celiac disease, autoimmune thyroid disease, autoimmune hepatitis and stiff-person syndrome [30-33]. However, in these cases, the anti-islet response occurs with a much lower frequency and intensity of the humoral response directed against pancreatic antigens [27].

Antibodies against glutamic acid decarboxylase

The 64 kD autoantibody was discovered in 1982 by Baekkesov, while the antigen to which it is directed (glutamic acid decarboxylase [GAD]) was only identified in 1990 [34, 35]. GAD,

the enzyme involved in converting glutamate to glutaminobutyric acid is present in GABAergic neurons and in pancreatic β -cells. In humans, there are two isoforms – 65 kD (GAD65) and 67 (GAD67) – encoded by two separate genes located on chromosomes 2 and 10, respectively. The proteins have structures that are 65% similar, with GAD 65 kD showing greater immunogenicity in diabetes [36].

This enzyme regulates the level of gammaaminobutyric acid (GABA) in the cytoplasm of the islet cells. It is believed that GABA inhibits the secretion of glucagon and somatostatin and participates in the secretion of insulin [37]. Moreover, this compound is a key substrate for the energy transformations in the Krebs cycle and the respiratory chain in β -cell mitochondria [36]. It is known that high blood glucose levels stimulate ATP synthesis in the mitochondrial membrane, which in turn determines insulin secretion and GABA transport to synaptic vesicles [37]. Considering the role of GAD in the pathogenesis of T1D, it is indicated that the abnormal action of the respiratory chain enzymes not only disturbs the energy balance of β -cells, but also blocks GABA transformations in the mitochondria [36]. This leads to the accumulation of glutamate in the cytoplasm of cells, which in turn stimulates the synthesis of GAD, catalysing the conversion of glutamic acid to GABA [35]. Cellular overexpression of GAD can lead to the presentation of this antigen on the surface of β -cells and the development of an autoimmune response.

At the time of T1D diagnosis, the presence of anti-GAD antibodies is detected in about 70-80% of patients (regardless of the age groups). Among relatives, anti-GAD occurs in about 10% of subjects. In the general population, this marker is detected in 2-3% of people [4].

Antibodies against tyrosine phosphatase

Insulinoma-associated antigen-2 (IA-2) is a transmembrane protein in the family of protein tyrosine phosphatases (PTPs). PTPs play a central role in modulating the transduction of cellular signals, including the cells of the immune system. Based on the current understanding of PTPs, it is clear that they impact antigen receptor signalling and cytokine signalling. This impact likely contributes to the development and progression of autoimmunity through multiple mechanisms, including failures of central and peripheral tolerance and the promotion of proinflammatory T cell responses [38]. Protein tyrosine phosphatase has two isoforms: IA-2 and IA-2 β (phogrin) [28]. IA-2 antibodies are more sensitive to T1D; they are found in 55-75% of patients, while antibodies against the IA-2 β protein occur in only 30-50% [25]. Among children with diabetes, anti-IA-2 is found in 50-80% of people, and more often and in higher titres in school-aged children (>7 years old) than in younger patients. Among relatives of children with T1D, anti-IA-2 is observed in 2-4% of people. In the general population, anti-IA-2 antibodies are detected, similarly to anti-GAD, in 2-4% of humans. Anti-IA-2 antibodies indicate a high risk of developing the disease, and this risk is greater when they are accompanied by IA-2 β antibodies. Both markers are detected relatively late, and are therefore a factor that signals a high risk of developing the disease [25].



Antibodies against endogenous insulin

Insulin, proinsulin and C-peptide are the only β -cell-specific antigens. Insulin is produced as a result of the conversion of preproinsulin into proinsulin, which in turn, under the influence of endopeptidases, is converted into insulin and C-peptide in a equimolar ratio. In the case of pancreatic islet destruction, they all stimulate the production of autoantibodies [39]. IAA antibodies were identified by Berson and Yalow in 1956-1957. Among patients with T1D, at the time of diagnosis, the presence of autoantibodies directed against insulin is found in about 40-50% [40]. IAA antibodies are much more common in younger children: they are found in over 90% of patients under 5 years of age, in about 70% of children aged 5-10 and in about 50% of older children and adolescents [41]. Among adults, IAA is observed in 10-20% of patients. The coexistence of IAA antibodies and ICA as well as the child's age at the time of IAA detection are factors that predict earlier appearance of the clinical form of the disease [25]. It is worth noting that IAA should be measured within 2 weeks of starting exogenous insulin therapy; after this time, antibodies may be produced in response to exogenous insulin, which precludes their use in confirming diagnoses.

Antibodies against zinc transporter 8

Studies from the last decade or so have resulted in the detection and identification of another antigen which are specific for β -cells and which induce a specific humoral reaction [42]. ZnT8 is a 369 amino acid transmembrane endoplasmic reticulum protein containing six domains and a histidine-rich loop between domains IV and V. ZnT8 plays an important role in regulating Zn^{2+} concentration in secretory granules and insulin secretion [43].

At the time of T1D diagnosis, antibodies against ZnT8 are detected in 60-80% of patients (in 26% of patients with no other marker of the humoral reaction [idiopathic T1D]). Evaluating the response against the ZnT8 protein reduces the number of patients without a confirmed autoimmune disease background from 5.8% to 1.5%. The use of the simultaneous measurement of ZnT8, GAD, IA-2 and insulin antibodies increases the detectability of T1D by over 98% [42].

There is a correlation between the occurrence of antibodies and the age of the patient. Antibodies against ZnT8 are rarely found in children under 3 years of age; the incidence rises to 80% in adolescents, but drops to about 60% in adults. During prediabetes, the frequency and titre of antibodies increase with the age of the child. ZnT8 antibodies are detectable in children over 2 years of age, and their level increases significantly in children over 8. They appear later than anti-GAD and IAA, at around the same time as anti-IA-2. The presence of these antibodies strongly correlates with anti-IA-2 antibodies, making them a parameter of late-onset humoral response and thus of a poor prognosis (progression from prediabetes to diabetes). However, the presence of only ZnT8 antibodies is associated with a low probability of developing diabetes, while the coexistence with other markers of the humoral reaction increases the risk of developing the

disease from 15% to 40% for a 5-year period. In as many as 40% of patients at the time of diagnosis, ICA antibodies are detected along with ZnT8 antibodies.

ZnT8 antibodies appear to be a specific marker of β -cell damage. In diseases coexisting with T1D, it is detected in 20% of patients, but without clinical symptoms of diabetes. In Addison's disease, ZnT8 antibodies are found in 8.6% of subjects, and in celiac disease without clinical symptoms of diabetes in as many as 30.8%. However, they are not observed in systemic connective tissue diseases [42, 43].

New antigens waiting to be characterised

The current, publicly available tests for the assessment of anti-islet antibodies appear insufficient to confirm all cases of T1D, as there is a subset of patients who do not have routine antibodies assessed at diagnosis [44]. This may be due to insufficiently sensitive tests or to the potential of different types of β -cell destruction mediated by autoantigen in these T1D patients, and therefore due to the existence of other, as yet undiscovered antibodies [45].

Total proteome measurements and bioinformatics expression analyses have shown that there are many new, rare autoantigens and associated antibodies that may potentially be useful in the diagnosis and monitoring of T1D: tetraspanin-7, heat shock proteins (HSP), carboxypeptidase E (CPE), islet-specific glucose-6-phosphatase-related protein (IGRP), islet amyloid polypeptide (IAPP) and imogen 38 [46, 47]. Among these new markers, the most important is tetraspanin-7 [48-52]. Currently, these new proteins are only being researched; there are no tests available on the market for *in vitro* diagnostic purposes.

Methods for T1D autoantibodies

The quality of the assays used to measure autoantibodies has improved significantly in the past decade thanks to the efforts of the Islet Autoantibody Standardization Program (IASP) [53]. The sensitivity and specificity of autoantibodies in the event of β -cell damage varies considerably depending on the method of measurement. Although highly specific, enzyme immunoassays (ELISA) have poor sensitivity compared to liquid-phase radioimmunoassays (gold standard). This difference is due to the weaker binding capacity at the boundary of the solid surface coated with the antigen than in the liquid phase [54]. Some manufacturers have also introduced tests that use electrochemiluminescence (ECL) or chemiluminescence (CLIA) for detection [53]. Ideally, laboratories should use the most sensitive and specific tests available. Research shows that ECL tests are better at identifying high affinity antibodies that are more likely to predict progression to T1D [55]. In addition, ECL tests identify IAA antibodies much earlier than isotope-labelled tests, which is very important for the prevention of diabetic ketoacidosis in young children. When this type of antibody is present, insulin-IAAb complexes form and prevent insulin from appropriately binding to its receptor postprandially, resulting in hyperglycaemia and leading to the severe,

life-threatening condition of ketoacidosis. In addition, this earlier detection of islet autoimmunity onset is important in finding potential environmental causes of diabetes and in our understanding of the aetiology of T1D [56]. Now, when autoantibody measurement tests offer the possibility of detecting T1D in the preclinical stage and avoiding diabetic ketoacidosis, scientists are focussing on developing general population screening strategies for islet autoimmunity [57, 58]. There are also attempts to optimise sampling, e.g. by using a dry blood drop or capillary blood samples instead of routinely used blood serum [59, 60]. Most laboratories testing for pancreatic islet cell autoantibodies offer all five commercially available antibodies.

CONCLUSIONS

As mentioned above, the T1D autoimmune markers are islet autoantibodies (ICA, GADA, IA-2A and ZnT8A) and anti-insulin antibodies (IAA). Clinical T1D is defined by the presence of two

or more of these serological markers, according to the latest guidelines [9, 61]. Therefore, it is recommended to measure all four autoantibodies (GADA, IA2-A, ZnT8A and IAA) to accurately diagnose the disease and maximise the sensitivity of autoimmune diabetes detection [62].

According to clinical practice guidelines, the determination of autoantibodies against pancreatic islet cell antigens is performed in the primary diagnosis or revision of a hyperglycaemia diagnosis. Such tests can also be performed in people at a high risk of developing T1D. The presence of a high titre of a single antibody or elevated titres of two antibodies indicates an active autoimmune process, apoptosis of pancreatic β -cells and a diagnosis of stage I (preclinical) diabetes. On the other hand, in type 2 diabetes, if the TPOAb (autoantibodies to thyroid peroxidase) titre is above the reference values, the typology of diabetes should be verified, primarily by determining the anti-GAD titre [9]. This approach will allow for faster diagnosis of people with T1D or at risk of developing diabetes.

REFERENCES

- IDF, 2022. IDF Diabetes Atlas, Tenth Edition. URL: <https://diabetesatlas.org>.
- Notkins AL, Lernmark Å. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *J Clin Invest*. 2001; 108(9): 1247–1252.
- Dotta F, Fondelli C, Di Mario U. Type 1 diabetes mellitus as a polygenic multifactorial disease: immunopathogenic mechanisms of beta-cell destruction. *Acta Bio-Medica Atenei Parm*. 2005; 76(Suppl 3): 14–18.
- Gianani R, Eisenbarth GS. The stages of type 1A diabetes: 2005. *Immunol Rev*. 2005; 204: 232–249. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00248.x
- Nguyen C, Varney MD, Harrison LC, Morahan G. Definition of High-Risk Type 1 Diabetes HLA-DR and HLA-DQ Types Using Only Three Single Nucleotide Polymorphisms. *Diabetes*. 2013; 62(6): 2135–2140. doi: 10.2337/db12-1398.
- Erich H, Valdes AM, Noble J, et al. HLA DR-DQ Haplotypes and Genotypes and Type 1 Diabetes Risk. *Diabetes*. 2008; 57(4): 1084–1092. doi: 10.2337/db07-1331.
- Couper JJ, Haller MJ, Ziegler AG, et al. Phases of type 1 diabetes in children and adolescents: Phases of type 1 diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2014; 15(S20): 18–25. doi: 10.1111/pedi.12188.
- Ziegler AG, Nepom GT. Prediction and Pathogenesis in Type 1 Diabetes. *Immunity*. 2010; 32(4): 468–478. doi: 10.1016/j.immuni.2010.03.018.
- Araszkiewicz A, Bandurska-Stankiewicz E, Borys S, et al. 2022 Guidelines on the management of patients with diabetes. A position of Diabetes Poland. *Curr Top Diabetes*. 2022; 2(1): 1–130.
- Long AE, George G, Williams CL. Persistence of islet autoantibodies after diagnosis in type 1 diabetes. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2021; 38(12): e14712. doi: 10.1111/dme.14712.
- Pihoker C, Gilliam LK, Hampe CS, Lernmark A. Autoantibodies in diabetes. *Diabetes*. 2005; 54(Suppl 2): S52–S61. doi: 10.2337/diabetes.54.suppl2.s52.
- Miao D. Role of Autoantibodies in Type 1 Diabetes. *Front Biosci*. 2007; 12(1): 1889. doi: 10.2741/2195.
- Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet Lond Engl*. 1974; 2(7892): 1279–1283. doi: 10.1016/s0140-6736(74)90140-8.
- Dozio N, Belloni C, Girardi AM, et al. Heterogeneous IgG Subclass Distribution of Islet Cell Antibodies. *J Autoimmun*. 1994; 7(1): 45–53. doi: 10.1006/jaut.1994.1004.
- Cavender DE, Rabin BS, Dorman JS, et al. Analyses on possible heterogeneity of IDDM based on presence of islet cell cytoplasmic antibody at diagnosis. *Autoimmunity*. 1989; 2(2): 113–122. doi: 10.3109/08916938909019948.
- Roep BO, Peakman M. Antigen Targets of Type 1 Diabetes Autoimmunity. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(4): a007781. doi: 10.1101/cshperspect.a007781.
- Winter W, Schatz D. Autoimmune markers in diabetes. *Clin Chem*. 2011; 57(2): 168–175. doi: 10.1373/clinchem.2010.148205.
- Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E. Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1995; 155(11): 5419–5426.
- Pilcher CC, Elliott RB. A sensitive and reproducible method for the assay of human islet cell antibodies. *J Immunol Methods*. 1990; 129(1): 111–117. doi: 10.1016/0022-1759(90)90427-w.
- Bingley PJ, Bonifacio E, Mueller PW. Diabetes Antibody Standardization Program: first assay proficiency evaluation. *Diabetes*. 2003; 52(5): 1128–1136. doi: 10.2337/diabetes.52.5.1128.
- Schlosser M, Mueller PW, Törn C, Bonifacio E, Bingley PJ. Participating Laboratories. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for insulin autoantibodies. *Diabetologia*. 2010; 53(12): 2611–2620. doi: 10.1007/s00125-010-1915-5.
- Törn C, Mueller PW, Schlosser M, Bonifacio E, Bingley PJ. Participating Laboratories. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. *Diabetologia*. 2008; 51(5): 846–852. doi: 10.1007/s00125-008-0967-2.
- Andersson C, Kolmodin M, Ivarsson SA, et al. Islet cell antibodies (ICA) identify autoimmunity in children with new onset diabetes mellitus negative for other islet cell antibodies. *Pediatr Diabetes*. 2014; 15(5): 336–344. doi: 10.1111/pedi.12093.
- Bonifacio E, Genovese S, Braghi S, et al. Islet autoantibody markers in IDDM: risk assessment strategies yielding high sensitivity. *Diabetologia*. 1995; 38(7): 816–822. doi: 10.1007/s001250050358.



25. Roll U, Ziegler AG. Combined antibody screening for improved prediction of IDDM – Modern strategies. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1997; 105(01): 1–14. doi: 10.1055/s-0029-1211721.
26. Spencer KM, Tarn A, Dean BM, Lister J, Bottazzo GF. Fluctuating islet-cell autoimmunity in unaffected relatives of patients with insulin-dependent diabetes. *Lancet Lond Engl*. 1984; 1(8380): 764–766. doi: 10.1016/s0140-6736(84)91278-9.
27. Urakami T, Miyamoto Y, Matsunaga H, Owada M, Kitagawa T. Serial changes in the prevalence of islet cell antibodies and islet cell antibody titer in children with IDDM of abrupt or slow onset. *Diabetes Care*. 1995; 18(8): 1095–1099. doi: 10.2337/diacare.18.8.1095.
28. Savola K, Sabbah E, Kulmala P et al. Autoantibodies associated with Type I diabetes mellitus persist after diagnosis in children. *Diabetologia*. 1998; 41(11): 1293–1297. doi: 10.1007/s001250051067.
29. Atkinson MA, Maclaren NK. Islet cell autoantigens in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest*. 1993; 92(4): 1608–1616. doi: 10.1172/JCI116745.
30. Cagliar E, Ugurlu S, Ozenoglu A, et al. Autoantibody Frequency in Celiac Disease. *Clinics*. 2009; 64(12): 1195–1200. doi: 10.1590/S1807-59322009001200009.
31. Oh KY, Kim YH, Yang EM, Kim CJ. Frequency of Diabetes and Thyroid Autoantibodies in Patients with Type 1 Diabetes and Their Siblings. *Chonnam Med J*. 2016; 52(2): 136–140. doi: 10.4068/cmj.2016.52.2.136.
32. Sallorenzo C, Silva R, Kasamatsu T, Dib S. Prevalence of pancreatic autoantibodies in non-diabetic patients with autoimmune thyroid disease and its relation to insulin secretion and glucose tolerance. *Arch Endocrinol Metab*. 2017; 61: 361–366. doi: 10.1590/2359-3997000000280.
33. Yamaguchi Y, Chikuba N, Ueda Y, et al. Islet cell antibodies in patients with autoimmune thyroid disease. *Diabetes*. 1991; 40(3): 319–322. doi: 10.2337/diab.40.3.319.
34. Baekkeskov S, Nielsen JH, Møller B, et al. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature*. 1982; 298(5870): 167–169. doi: 10.1038/298167a0.
35. Degli Esposti M, Mackay IR. The GABA network and the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia*. 1997; 40(3): 352–356. doi: 10.1007/s001250050687.
36. Sorenson RL, Garry DG, Brelje TC. Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans. Beta-cells and nerves. *Diabetes*. 1991; 40(11): 1365–1374. doi: 10.2337/diab.40.11.1365.
37. Duchon MR, Smith PA, Ashcroft FM. Substrate-dependent changes in mitochondrial function, intracellular free calcium concentration and membrane channels in pancreatic beta-cells. *Biochem J*. 1993; 294(Pt 1): 35–42. doi: 10.1042/bj2940035.
38. Cerosaletti K, Buckner JH. Protein Tyrosine Phosphatases and Type 1 Diabetes: Genetic and Functional Implications of PTPN2 and PTPN22. *Rev Diabet Stud RDS*. 2012; 9(4): 188–200. doi: 10.1900/RDS.2012.9.188.
39. Kuglin B, Rjasanowski I, Bertrams J, et al. Antibodies to proinsulin and insulin as predictive markers of type 1 diabetes. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 1990; 7(4): 310–314. doi: 10.1111/j.1464-5491.1990.tb01395.x.
40. Berson SA, Yalow RS. Studies with insulin-binding antibody. *Diabetes*. 1957; 6(5): 402–405, discussion 405–407. doi: 10.2337/diab.6.5.402.
41. Berson SA, Yalow RS. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J Clin Invest*. 1959; 38: 1996–2016. doi: 10.1172/JCI103979.
42. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci*. 2007; 104(43): 17040–17045. doi: 10.1073/pnas.0705894104.
43. Chimienti F, Devergnas S, Pattou F, et al. In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. *J Cell Sci*. 2006; 119(Pt 20): 4199–4206. doi: 10.1242/jcs.03164.
44. Bonifacio E, Achenbach P. Birth and coming of age of islet autoantibodies. *Clin Exp Immunol*. 2019; 196(3): 294–305. doi: 10.1111/cei.13360.
45. Yi L, Swensen AC, Qian WJ. Serum biomarkers for diagnosis and prediction of type 1 diabetes. *Transl Res J Lab Clin Med*. 2018; 201: 13–25. doi: 10.1016/j.trsl.2018.07.009.
46. Massa O, Alessio M, Russo L, et al. Serological Proteome Analysis (SERPA) as a tool for the identification of new candidate autoantigens in type 1 diabetes. *J Proteomics*. 2013; 82: 263–273. doi: 10.1016/j.jprot.2013.02.030.
47. Wenzlau JM, Hutton JC. Novel Diabetes Autoantibodies and Prediction of Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep*. 2013; 13(5): 10.1007/s11892-013-0405-0409. doi: 10.1007/s11892-013-0405-9.
48. Eugster A, Kraus G, Lidzba V, et al. Cytoplasmic ends of tetraspanin 7 harbour epitopes recognised by autoantibodies in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2019; 62(5): 805–810. doi: 10.1007/s00125-019-4832-2.
49. McLaughlin KA, Richardson CC, Ravishanker A, et al. Identification of Tetraspanin-7 as a Target of Autoantibodies in Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2016; 65(6): 1690–1698. doi: 10.2337/db15-1058.
50. McLaughlin KA, Tombs MA, Christie MR. Autoimmunity to tetraspanin-7 in type 1 diabetes. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 2020; 209(4): 437–445. doi: 10.1007/s00430-020-00674-2.
51. Shi XJ, Zheng PL, Wang Z, et al. The establishment and application of testing methods of tetraspanin 7 autoantibody in type 1 diabetes. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2021; 101(4): 243–248. doi: 10.3760/cma.j.cn112137-20200505-01427.
52. Walther D, Eugster A, Jergens S, et al. Tetraspanin 7 autoantibodies in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2016; 59(9): 1973–1976. doi: 10.1007/s00125-016-3997-1.
53. Lampasona V, Pittman DL, Williams AJ, et al. Islet Autoantibody Standardization Program 2018 Workshop: Interlaboratory Comparison of Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibody Assay Performance. *Clin Chem*. 2019; 65(9): 1141–1152. doi: 10.1373/clinchem.2019.304196.
54. Kawasaki E, Okada A, Uchida A, et al. Discrepancy of glutamic acid decarboxylase 65 autoantibody results between RSR radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay in patients with type 1 diabetes is related to autoantibody affinity. *J Diabetes Investig*. 2019; 10(4): 990. doi: 10.1111/jdi.12996.
55. Miao D, Guyer KM, Dong F, et al. GAD65 Autoantibodies Detected by Electrochemiluminescence Assay Identify High Risk for Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2013; 62(12): 4174–4178. doi: 10.2337/db13-0534.
56. Yu L, Dong F, Miao D, et al. Proinsulin/Insulin Autoantibodies Measured With Electrochemiluminescent Assay Are the Earliest Indicator of Prediabetic Islet Autoimmunity. *Diabetes Care*. 2013; 36(8): 2266–2270. doi: 10.2337/dc12-2245.
57. Simmons KM, Youngkin E, Alkanani A, et al. Screening children for type 1 diabetes-associated antibodies at community health fairs. *Pediatr Diabetes*. 2019; 20(7): 909. doi: 10.1111/pedi.12902.
58. Siraj ES, Rogers DG, Gupta MK, Reddy SSK. A Simple Screening Method for Individuals at Risk of Developing Type 1 Diabetes: Measurement of Islet Cell Autoantibodies (GADA, IA-2A, and IAA) on Dried Capillary Blood Spots Collected on Filter Paper. *Horm Metab Res*. 2012; 44(11): 855–860. doi: 10.1055/s-0032-1316349.
59. Bingley PJ, Rafkin LE, Matheson D, et al. Use of Dried Capillary Blood Sampling for Islet Autoantibody Screening in Relatives: A Feasibility Study. *Diabetes Technol Ther*. 2015; 17(12): 867–871. doi: 10.1089/dia.2015.0133.
60. Liu Y, Rafkin LE, Matheson D, et al. Use of self-collected capillary blood samples for islet autoantibody screening in relatives: a feasibility and acceptability study. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 2017; 34(7): 934. doi: 10.1111/dme.13338.
61. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes – 2022. *Diabetes Care*. 2021; 45(Suppl_1): S17–S38. doi: 10.2337/dc22-S002.
62. Wang CCL, Shah AC. Medical Management of Type 1 Diabetes. American Diabetes Association; 2016.



Article

Could I-FABP Be an Early Marker of Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes? Retrospective Study from the Tertiary Reference Centre

Agnieszka Ochocińska ^{1,*}, Marta Wysocka-Mincewicz ², Artur Groszek ², Anna Rybak ³, Ewa Konopka ⁴, Joanna Beata Bierła ⁴, Ilona Trojanowska ⁴, Mieczysław Szalecki ^{2,5} and Bożena Cukrowska ⁴

¹ Department of Biochemistry, Radioimmunology and Experimental Medicine, The Children's Memorial Health Institute, Aleja Dzieci Polskich 20, 04-730 Warsaw, Poland

² Department of Endocrinology and Diabetology, The Children's Memorial Health Institute, Aleja Dzieci Polskich 20, 04-730 Warsaw, Poland; m.wysocka@ipczd.pl (M.W.-M.); a.groszek@ipczd.pl (A.G.); m.szalecki@ipczd.pl (M.S.)

³ Department of Gastroenterology, Great Ormond Street Hospital NHS Trust, Great Ormond Street, London WC1N 3JH, UK; anna.rybak@gosh.nhs.uk

⁴ Department of Pathomorphology, The Children's Memorial Health Institute, Aleja Dzieci Polskich 20, 04-730 Warsaw, Poland; e.konopka@ipczd.pl (E.K.); j.bierla@ipczd.pl (J.B.); i.trojanowska@ipczd.pl (I.T.); b.cukrowska@ipczd.pl (B.C.)

⁵ Collegium Medicum, Jan Kochanowski University, Aleja Dł. Wieków Kielce 19A, 25-317 Kielce, Poland

* Correspondence: a.ochocinska@ipczd.pl; Tel: +48-22-815-73-01



Citation: Ochocińska, A.;

Wysocka-Mincewicz, M.; Groszek, A.;

Rybak, A.; Konopka, E.; Bierła, J.B.;

Trojanowska, I.; Szalecki, M.;

Cukrowska, B. Could I-FABP Be an

Early Marker of Celiac Disease in

Children with Type 1 Diabetes?

Retrospective Study from the Tertiary

Reference Centre. *Nutrients* **2022**, *14*,

414. [https://doi.org/10.3390/](https://doi.org/10.3390/nu14030414)

[nu14030414](https://doi.org/10.3390/nu14030414)

Academic Editor: Francesca Ferretti

Received: 16 December 2021

Accepted: 16 January 2022

Published: 18 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2022 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article

distributed under the terms and

conditions of the Creative Commons

Attribution (CC BY) license ([https://](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

[creativecommons.org/licenses/by/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

[4.0/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)).

Abstract Patients with type 1 diabetes (T1D) are at higher risk of celiac disease (CD). Recently, intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) has been shown to be a serological biomarker of impaired intestinal barrier in CD. Thus, the aim of this study was to verify whether I-FABP could be an early marker of CD in pediatric T1D patients. I-FABP was measured in sera of patients with T1D ($n = 156$), active CD ($n = 38$), T1D with active CD (T1D-CD, $n = 51$), and age-matched healthy children ($n = 55$). Additionally, I-FABP was determined in T1D patients with negative CD serology at least one year before CD diagnosis (T1D-CD-1, $n = 22$), in CD patients on a gluten-free diet (CD-GFD, $n = 36$), and T1D-CD patients on GFD (T1D-CD-GFD, $n = 39$). Sera were tested using immunoenzymatic assay. Significantly increased levels of I-FABP were found in the T1D, active CD, and T1D-CD groups (1153 ± 665 , 1104 ± 916 , and 1208 ± 878 , respectively) in comparison to healthy with controls (485 ± 416 , $p < 0.05$). GFD induced a significant decrease in I-FABP levels in CD and T1D-CD groups (510 ± 492 and 548 ± 439 , respectively). Interestingly, in T1D-CD-1 and T1D, I-FABP levels were comparable (833 ± 369 vs. 1153 ± 665), and significantly increased in relation to healthy controls and T1D-CD values on GFD. The results indicate that the epithelial barrier is disrupted in T1D patients independently of CD development; therefore, I-FABP cannot serve as an early marker of CD in T1D patients. Although GFD can improve epithelial recovery, the question remains as to whether GFD could exert beneficial effects on the intestinal barrier in early stages of T1D.

Keywords: type 1 diabetes; celiac disease; biomarker; intestinal fatty acid binding protein; impaired epithelial barrier; I-FABP; gluten-free diet; intestinal barrier

1. Introduction

Type 1 diabetes (T1D) is a multifactorial and complex autoimmune disease. Its comorbidity with other autoimmune diseases, including celiac disease (CD), is well established. The co-diagnosis of CD affects from 2 to 16% of diabetic patients worldwide [1]. According to the latest Polish reports, the frequency of CD among T1D patients is now much higher than ten years ago (8.3% vs. 5.7%) and higher in girls (13.9%) than boys (4.9%), which is in line with previous reports by Cerutti et al. about the higher risk of having both diseases for girls than for boys [2,3].

The relationship between T1D and CD is being intensively studied [4]. The human leukocyte antigen (HLA) analysis showed that haplotypes occurring in almost all patients with CD (HLA-DQ2 and HLA-DQ8) exist in the majority of patients with T1D, which confirms the hypothesis concerning the common genetic pathogenesis of both diseases [5,6]. Common genetic features of T1D and CD were also documented in the genome-wide association study (GWAS), suggesting the role of impaired mucosal barrier function in the etiopathogenesis of both diseases [7]. In the altered gut barrier, non-competent intercellular junctions allow antigens, derived from the food or intestinal microbiota, to enter the circulation and activate the immune system into upregulated autoimmune responses [8].

Although the coexistence of CD and T1D is well known, the diagnosis of CD among diabetic patients remains a clinical challenge due to the fact that 60% to 70% of T1D children present with asymptomatic or non-classical CD [2]. Prompt diagnosis is necessary because untreated CD disrupts the absorption of nutrients by damaging the small intestine, therefore resulting in an increased risk of hypoglycemia. Undiagnosed CD in T1D patients may result in poor glycemic control, leading to more complications and, in consequence, insufficient treatment of retinopathy, nephropathy or dyslipidemia. This is why all experts agree that screening tests for CD should be performed for all T1D patients [9]. Due to the high frequency of CD-specific HLA haplotypes in T1D, genetic HLA-DQ2 and HLA-DQ8 testing, as a first-line screening, suggested by the European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) [10], is questionable. For this reason, CD serological markers are recommended by the International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes (ISPAD) for all T1D patients, independently of symptomatology [11].

Nevertheless, new biomarkers are still being sought to enable the detection of intestinal epithelial damage at earlier stages. Recently, intestinal fatty acid binding proteins (I-FABP) were presented as novel serological biomarkers of active CD [12–14]. Elevated concentrations of I-FABP were observed in patients with untreated CD. Moreover, treatment with a gluten-free diet (GFD) induced the rapid normalization of I-FABP levels [14–16].

I-FABP is described as a low-molecular-weight (14–15 kDa) water-soluble extracellular protein, a type of fatty acid binding protein [17]. This protein is expressed in the epithelial cells of the mucous layer of the small intestine, and, in cases of epithelium damage, its increased concentration is observed in the blood [18,19].

Thus, the aim of our study was to assess whether I-FABP could be an early marker of CD in children with T1D.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Study Design

We performed an analysis of a retrospective research group collected prospectively as part of screening and subjected to post hoc analysis after the onset of celiac disease.

The study involved children with T1D and/or CD hospitalized in the Children's Memorial Health Institute in Warsaw (Poland) in the period between 2012 and 2018. A case-control study was performed on patients with T1D ($n = 156$), with T1D and active CD (T1D-CD, $n = 51$), and with active CD only ($n = 38$), who were randomly chosen from this database. The patients' characteristics are presented in Table 1. T1D patients who displayed no CD serological markers at diagnosis were annually serologically screened for CD, and a subgroup of patients who were eventually diagnosed with CD but had only T1D one year prior to diagnosis (T1D-CD-1 group, $n = 22$) were selected. In addition, among patients with T1D-CD and CD, a subgroup of patients who had been following GFD for at least 6 months was distinguished (CD-GFD, $n = 36$; T1D-CD-GFD, $n = 39$). Healthy children formed the control group (HC, $n = 55$).

T1D was diagnosed according to the recommendations of the ISPAD [11,20], and CD according to the ESPGHAN criteria [10]. Routine serological tests necessary to perform a diagnosis were performed in Department of Biochemistry, Radioimmunology and Experimental Medicine, and Department of Pathomorphology at The Children's Memorial Health Institute (for T1D: anti-glutamic decarboxylase (anti-GAD), anti-tyrosine phosphatase

(anti-IA2), anti-islet cell (ICA) antibodies, and for CD: serum anti-tissue transglutaminase antibody (anti-tTg Ab)). Patients and control group with current inflammation, hypoxia, and coexisting diseases of other causes were excluded from the study. All healthy controls had negative serological screening test.

Table 1. Characteristics of main study group: type 1 diabetes (T1D), type 1 diabetes with celiac disease (T1D-CD), celiac disease (CD). Separate subgroups: celiac disease on gluten-free diet (CD-GFD), type 1 diabetes with celiac disease on gluten-free diet (T1D-CD-GFD), and healthy controls (HC).

Cohort	Study Group (n = 245)			Control Group (n = 55)
	T1D	T1D-CD (T1D-CD-GFD)	CD (CD-GFD)	HC
Sample size	156	51 (39)	38 (36)	55
Gender				
Female	83	28 (20)	24 (22)	27
Male	73	23 (19)	14 (14)	28
Mean age in years	12	7 (7)	8 (8)	10
Mean age of T1D onset in years	9	6 (6)	NA (NA)	NA

T1D—type 1 diabetes, T1D-CD—type 1 diabetes and celiac disease, CD—celiac disease, CD-GFD—celiac disease on gluten-free diet, T1D-CD-GFD—type 1 diabetes and celiac disease on gluten-free diet, HC—healthy controls, NA—not applicable

2.2. I-FABP Measurement

I-FABP was measured in the sera of patients and control group using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Hycult Biotech Inc., Wayne, PA, USA) according to the manufacturer's instructions. Absorbance values were measured using a BioTek PowerWave Microplate Spectrophotometer at a wavelength of 450 nm. Results were expressed as mean \pm standard deviation (SD) in picograms/milliliters (pg/mL).

2.3. Statistical Analysis

Data were analyzed using Statistica v.10.0 software (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Standard deviations of means were used as descriptive statistics. Normal distribution was checked using the Shapiro–Wilk test and revealed non-normal distribution of data. Differences between two groups were tested by U Mann–Whitney test, and between three or more subgroups by Kruskal–Wallis ANOVA by Ranks for independent groups. If differences were significant, post hoc analysis using Dunn–Bonferroni test was then performed. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to obtain the specificity and sensitivity of serum I-FABP to distinguish diabetic patients with CD from those without CD.

Analysis of parameters in two time points were performed using Wilcoxon signed-rank test for dependent samples. In all tests, p values < 0.05 were considered significant.

2.4. Ethical Approval

The study was approved by the Local Ethics Committee from the Children's Memorial Health Institute with written informed consent obtained from participants over 16 years of age and/or their legal representative, as appropriate.

3. Results

3.1. I-FABP Levels in Sera of T1D Patients without CD, Patients with Active CD, and Patients with T1DM and CD

There was a significant difference in I-FABP levels between the three study groups (T1D, active CD, and T1D-CD) and healthy controls: 1153 ± 665 , 1104 ± 916 , 1208 ± 878 vs. 485 ± 416 pg/mL, respectively; ($p < 0.001$) (Figure 1).

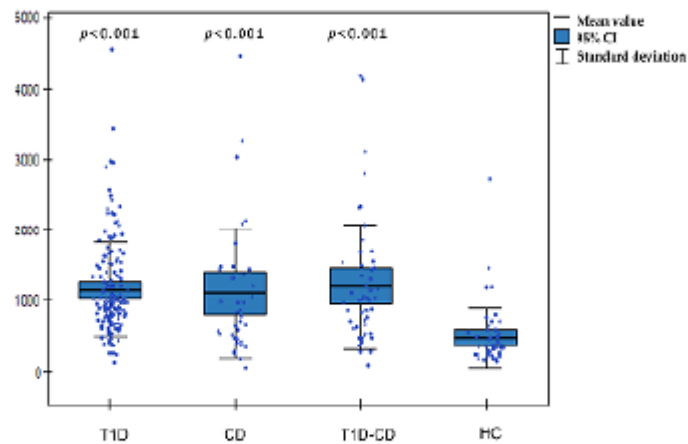


Figure 1. Boxplot chart illustrates the distribution of I-FABP concentrations in T1D, CD, T1D-CD, and HC. T1D—type 1 diabetes, CD—celiac disease, T1D-CD—type 1 diabetes and celiac disease, HC—healthy controls; p values were calculated by Kruskal–Wallis test.

However, the statistical analysis did not show statistically significant differences between the groups (T1D, active CD, and T1D-CD patients). The ROC curve to detect CD in T1D patients revealed an area under curve (AUC) of 0.557 (95% confidence interval, CI: 0.485–0.628, $p > 0.05$) for I-FABP. A serum I-FABP concentration of >965 pg/mL was associated with the coexistence of both diseases, with a sensitivity of 51.7% and specificity of 59.7% (Figure 2).

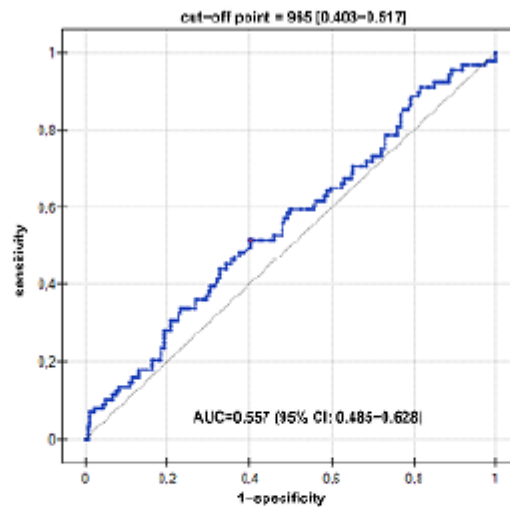


Figure 2. Diagnostic value of I-FABP as a marker of CD in T1D patients. AUC—area under curve, CI—confidence interval.

3.2. The Effect of GFD on I-FABP Concentrations

The serum level of I-FABP were substantially diminished in patients on GFD (Figure 3) and in both study groups (CD and T1D-CD), it reached values similar to those of the healthy control group. At least 6 months of GFD in T1D-CD patients induced a decrease in I-FABP

concentration by 54.6% (from 1208 ± 878 to 548 ± 439 pg/mL). There were significant differences between patients with T1D-CD without dietetic treatment and on GFD (1208 ± 878 and 548 ± 439 , respectively) as well as between the T1D-CD group and controls (1208 ± 878 pg/mL and 485 ± 416 pg/mL, respectively) (Figure 3A). In the case of CD patients, GFD resulted in a decrease in I-FABP concentration by 53.8% (from 1104 ± 916 to 510 ± 492 pg/mL). The differences between patients with active CD, before and after GFD treatment, as well as the control group, were statistically significant (1104 ± 916 vs. 510 ± 492 and 485 ± 416 pg/mL, respectively) (Figure 3B).

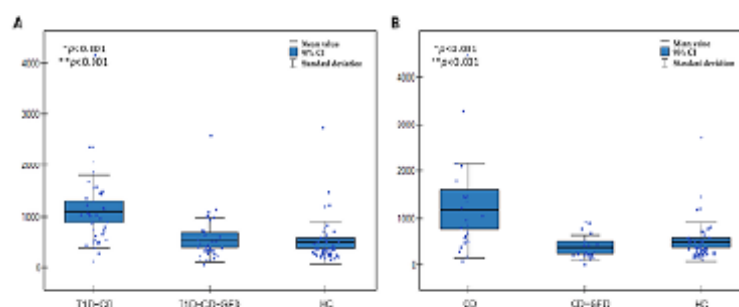


Figure 3. Boxplot chart illustrates the distribution of I-FABP concentrations in T1D-CD, T1D-CD-GFD, and HC patients (A) and CD, CD-GFD, and HC patients (B); *p* values were calculated by Wilcoxon signed-rank test; * *p*—T1D-CD (A) or CD (B) vs. HC, ** *p*—T1D-CD (A) or CD (B) vs. T1D-CD-GFD (A) or CD-GFD (B). T1D-CD—type 1 diabetes and celiac disease, T1D-CD-GFD—type 1 diabetes and celiac disease on gluten free diet, HC—healthy controls, CD—celiac disease, CD—celiac disease on gluten-free diet

3.3. I-FABP Concentrations Prior to CD Diagnosis in Patients with Type 1 Diabetes

Mean value of I-FABP in the subgroup of patients with negative CD serology one year before CD diagnosis (T1D-CD-1) was not statistically significant different from that of T1D patients (833 ± 369 vs. 1153 ± 665 pg/mL, respectively). However, it differed significantly from the control group and T1D-CD patients after GFD treatment (833 ± 369 vs. 485 ± 416 and 548 ± 439 pg/mL, respectively) (Figure 4).

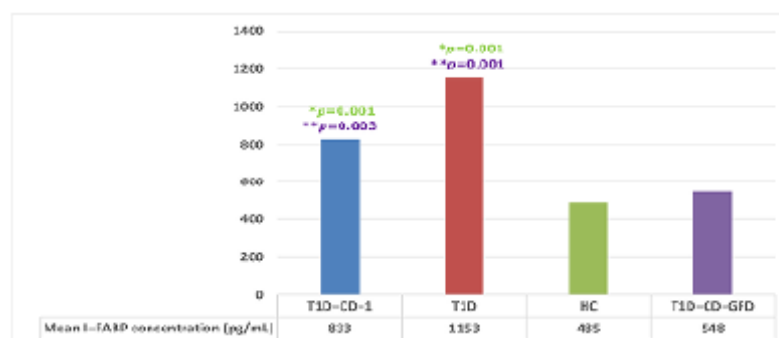


Figure 4. I-FABP concentrations in T1D-CD-1 group in relation to T1D, HC, and T1D-CD-GFD patients; *p* values were calculated by Wilcoxon signed-rank test; colors of *p* value fonts correspond to bars of study groups; * *p*—T1D-CD-1 or T1D vs. HC, ** *p*—T1D-CD-1 or T1D vs. T1D-CD-GFD. T1D-CD—type 1 diabetes and celiac disease patients with negative CD serology one year before CD diagnosis, T1D—type 1 diabetes, HC —healthy controls, T1D-CD-GFD—type 1 diabetes and celiac disease on gluten-free diet, I-FABP—intestinal fatty acid binding protein.

4. Discussion

The early detection of CD may be of crucial importance for patients with T1D, as numerous studies indicate that the treatment with GFD of patients with T1D and CD improves blood glucose control [21].

International experts on CD and T1D (ESPGHAN, ISPAD) agree on the necessity of screening diabetic patients with T1D for CD, but there is no consensus on the length of follow-up, testing frequency, and type of testing [10,11]. Due to the fact that HLA genotyping in patients with T1D is not sufficient to identify patients with an increased risk of CD, and that serological screening for CD allows the detection of the disease process only at an advanced stage, when severe histological changes are present in the small intestine, as well as the fact that the spontaneous normalization of celiac specific antibodies is observed in some T1D patients, the search for new, early CD biomarkers in order to detect potential cases of CD is of key importance [22,23].

For this reason, we evaluated the utility of I-FABP—a recognized serological marker of intestinal epithelium damage in CD—as an early marker in T1D patients. To our knowledge, this is the first study describing such a relationship in a pediatric cohort.

The current study shows that the concentration of I-FABP is significantly elevated both in CD and T1D patients in comparison to healthy individuals, indicating small intestinal epithelium damage in both patient cohorts. However, there were no differences between the study groups, suggesting that the gut leakage, measured by I-FABP concentration, can be an independent predictor of CD development. This result was confirmed by the analysis of the ROC curve, based on which it can be concluded that I-FABP is not a good diagnostic marker of CD in T1D patients. This biomarker offers no ability to separate the two clinical conditions. The statistically determined optimal cut-off value of I-FABP for active CD at the level of 965 pg/mL, produced sensitivity and specificity of only 51.7 and 59.7%, respectively. The analysis of the I-FABP concentrations in T1D-CD-1 in relation to T1D showed that even in the period preceding the onset of CD, its levels were elevated. This result clearly indicates that damage to the intestinal epithelial barrier is independent of the presence of CD.

These results support the previous hypothesis of the loss of intestinal barrier integrity in T1D resulting in low-grade chronic inflammation as well as increased diffusion of bacterial components into the blood. Previous studies showed intestinal barrier dysfunction assessed by measuring blood markers of intestinal damage or bacterial translocation other than I-FABP [24–26]. Elevated levels of zonulin [27–29], cytokeratin 18 caspase-cleaved fragment [30], lipopolysaccharides [28], and peptidoglycans [31] indicate both increased paracellular permeability and a profound damage to the intestine, allowing bacterial components to enter the bloodstream. Vaarala pointed out that the concentration of zonulin, the protein regulating the functioning of epithelial tight junctions, correlated with increasing intestinal permeability measured by the functional lactulose/mannitol test [26,27,32].

It is known that GFD is an effective treatment for celiac patients, inducing clinical recovery, the normalization of histopathological changes in the small intestine, and the normalization of serum autoantibody levels [33,34]. In this study, we found that GFD used for a minimum of 6 months decreased the concentration of I-FABP in CD and T1DM-CD patients by at least 50%. This finding indicates that gut barrier integrity can be significantly improved with proper dietary management. Interestingly, GFD in T1D-CD patients induced a I-FABP decrease, achieving the level observed in healthy controls. However, this observation does not answer the question of whether GFD may be effective in T1D patients without CD. The hypothesis that gluten is harmful not only to patients with CD but also to those with other autoimmune diseases was suggested recently [33,35]. Researchers suggest that GFD may offer the potential to reduce the risk of T1D [36], and a few studies indicate that GFD, when applied to older children with T1D, may protect beta cells from destruction to some extent. Undoubtedly, various factors determine the impact of GFD on the autoimmune response of pancreatic islets detected at the time of CD diagnosis: adherence

to GFD and its duration, the type and concentration of anti-diabetic autoantibodies, and the asymptomatic clinical picture of CD [37].

While GFD can improve the intestinal epithelium in diabetic patients with CD, it is still an open question whether GFD could exert beneficial effects on the intestinal barrier in the early stages of T1D, protecting patients from the development of other autoimmune disorders, including CD, or impacting the clinical course of T1D.

5. Limitations and Strengths

We recognize some limitations of our study. First of all, it was limited by the relatively small number of patients. Secondly, we did not perform a sample size estimation. This is why when we found no difference between the study subgroups, it was difficult to determine whether this lack of difference was caused by the sample size. However, we believe that it is worth highlighting in our research that, due to access to such a broad clinical database (over a six-year period), it was possible to identify T1D patients who developed CD as a comorbid disease during this period. Thus, it was possible to retrospectively assess the concentration of I-FABP in the period of T1D only, one year before the appearance of CD serological markers (T1D-CD-1 group) and after classification in the T1D-CD group (after CD diagnosis). Moreover, the strength of this study is that all the T1D patients were serologically screened for celiac disease.

6. Conclusions

In summary, the evidence from this study suggests that I-FABP cannot serve as a potential early biomarker for diagnosis of CD in T1D patients, but it can be used as a serological marker indicating epithelial damage in pediatric T1D.

Author Contributions: Conceptualization, B.C. and A.O.; methodology, B.C., J.B.B.; software, A.O.; validation, A.O., B.C. and M.S.; formal analysis, B.C.; investigation, A.O., E.K., J.B.B. and I.T.; resources, M.W.-M., A.G.; A.R.; data curation, E.K., I.T., A.O. and A.G.; writing—original draft preparation, A.O.; writing—review and editing, B.C.; visualization, A.O.; supervision, B.C., M.S. and M.W.-M.; funding acquisition, A.O., B.C. and A.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by The Children’s Memorial Health Institute, grant numbers: S147/2016, S156/2017, 259/2018, M41/19.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by Ethics Committee of The Children’s Memorial Health Institute (protocol code: 62/KBE/2016, date of approval: 14 December 2016, 47/KBE/2017, date of approval: 6 September 2017, 51/KBE/2018, date of approval: 21 November 2018, 18/KBE/2019, date of approval: 24 April 2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy protections.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Pham-Short, A.; Donaghue, K.C.; Ambler, G.; Phelan, H.; Twigg, S.; Craig, M.E. Screening for Celiac Disease in Type 1 Diabetes: A Systematic Review. *Pediatrics* **2015**, *136*, e170–e176. [CrossRef]
2. Cerutti, F.; Bruno, G.; Chiarelli, F.; Lorini, R.; Meschi, F.; Sacchetti, C. Diabetes Study Group of the Italian Society of Pediatric Endocrinology and Diabetology. Younger age at onset and sex predicts celiac disease in children and adolescents with type 1 diabetes: An Italian multicenter study. *Diabetes Care* **2004**, *27*, 1294–1298. [CrossRef] [PubMed]

3. Wędrychowicz, A.; Minasyan, M.; Pietraszek, A.; Centkowski, J.; Stręk, M.; Różańska, J.; Chelmecka, K.; Zdzierak, B.; Wilk, M.; Czekańska, P.; et al. Increased prevalence of celiac disease and its clinical picture among patients with diabetes mellitus type 1—Observations from a single pediatric center in Central Europe. *Pediatr. Endocrinol. Diabetes Metab.* **2021**, *27*, 1–6. [[CrossRef](#)]
4. Lette, G.; Rioux, J.D. Autoimmune diseases: Insights from genome-wide association studies. *Hum. Mol. Genet.* **2008**, *17*, 116–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Achury, J.G.; Romanos, J.; Bakker, S.F.; Kumar, V.; de Haas, E.C.; Trynka, G.; Ricaño-Ponce, I.; Steck, A.; Type 1 Diabetes Genetics Consortium; Chen, W.M.; et al. Contrasting the genetic background of type 1 diabetes and celiac disease autoimmunity. *Diabetes Care* **2015**, *38*, 37–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Smyth, D.J.; Plagnol, V.; Walker, N.M.; Cooper, J.D.; Downes, K.; Yang, J.H.; Howson, J.M.; Stevens, H.; McManus, R.; Wijmenga, C.; et al. Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 2767–2777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Zhernakova, A.; Withoff, S.; Wijmenga, C. Clinical implications of shared genetics and pathogenesis in autoimmune diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2013**, *9*, 646–659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Cukrowska, B.; Sowińska, A.; Bierla, J.B.; Czarnowska, E.; Rybak, A.; Grzybowska-Chlebowczyk, U. Intestinal epithelium, intraepithelial lymphocytes and the gut microbiota—Key players in the pathogenesis of celiac disease. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 7505–7518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Akirov, A.; Pinhas-Hamiel, O. Co-occurrence of type 1 diabetes mellitus and celiac disease. *World J. Diabetes* **2015**, *6*, 707–714. [[CrossRef](#)]
10. Husby, S.; Koletzko, S.; Korponay-Szabó, I.R.; Mearin, M.L.; Phillips, A.; Shamir, R.; Troncone, R.; Giersiepen, K.; Branski, D.; Catassi, C.; et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of celiac disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2012**, *54*, 136–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Mahmud, F.H.; Elbarbary, N.S.; Fröhlich-Reiterer, E.; Holl, R.W.; Kordonouri, O.; Krip, M.; Simmons, K.; Craig, M.E. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Other complications and associated conditions in children and adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr. Diabetes* **2018**, *19*, 275–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Oldenburger, I.B.; Wolters, V.M.; Kardol-Hoefnagel, T.; Houwen, R.H.J.; Otten, H.G. Serum intestinal fatty acid-binding protein in the noninvasive diagnosis of celiac disease. *APMIS* **2018**, *126*, 186–190. [[CrossRef](#)]
13. Ho, S.S.C.; Keenan, J.L.; Day, A.S. The role of gastrointestinal-related fatty acid-binding proteins as biomarkers in gastrointestinal diseases. *Dig. Dis. Sci.* **2020**, *65*, 376–390. [[CrossRef](#)]
14. Adriaanse, M.P.M.; Mubarak, A.; Riedl, R.G.; Ten Kate, F.J.W.; Damoiseaux, J.G.M.C.; Buurman, W.A.; Houwen, R.H.J.; Vreugdenhil, A.C.E.; Celiac Disease Study Group. Progress towards non-invasive diagnosis and follow-up of celiac disease in children; a prospective multicentre study to the usefulness of plasma I-FABP. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8671. [[CrossRef](#)]
15. Derikx, J.P.; Vreugdenhil, A.C.; Van den Neucker, A.M.; Grootjans, J.; van Bijnen, A.A.; Damoiseaux, J.G.; van Heurn, L.W.; Heineman, E.; Buurman, W.A. A pilot study on the noninvasive evaluation of intestinal damage in celiac disease using I-FABP and L-FABP. *J. Clin. Gastroenterol.* **2009**, *43*, 727–733. [[CrossRef](#)]
16. Adriaanse, M.P.; Tack, G.J.; Passos, V.L.; Damoiseaux, J.G.; Schreurs, M.W.; van Wijck, K.; Riedl, R.G.; Masclee, A.A.; Buurman, W.A.; Mulder, C.J.; et al. Serum I-FABP as marker for enterocyte damage in celiac disease and its relation to villous atrophy and circulating autoantibodies. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2013**, *37*, 482–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Hotamisligil, G.S.; Bernlohr, D.A. Metabolic functions of FABPs—Mechanisms and therapeutic implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2015**, *11*, 592–605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Lau, E.; Marques, C.; Pestana, D.; Santoalha, M.; Carvalho, D.; Freitas, P.; Calhau, C. The role of I-FABP as a biomarker of intestinal barrier dysfunction driven by gut microbiota changes in obesity. *Nutr. Metab.* **2016**, *13*, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Pelsers, M.M.; Namiot, Z.; Kisielewski, W.; Namiot, A.; Januszkiewicz, M.; Hermens, W.T.; Glatz, J.F. Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin. Biochem.* **2003**, *36*, 529–535. [[CrossRef](#)]
20. Clinical Diabetology. 2018 Guidelines on the management of diabetic patients. A position of Diabetes Poland. *Clin. Diabet.* **2018**, *7*, 1. [[CrossRef](#)]
21. Sun, S.; Puttha, R.; Ghezael, S.; Skae, M.; Cooper, C.; Amin, R.; Northwest England Paediatric Diabetes Network. The effect of biopsy-positive silent coeliac disease and treatment with a gluten-free diet on growth and glycaemic control in children with Type 1 diabetes. *Diabet. Med.* **2009**, *26*, 1250–1254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Sud, S.; Marcon, M.; Assor, E.; Palmert, M.R.; Daneman, D.; Mahmud, F.H. Celiac disease and pediatric type 1 diabetes: Diagnostic and treatment dilemmas. *Int. J. Pediatr. Endocrinol.* **2010**, *2010*, 161285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Unal, E.; Demiral, M.; Baysal, B.; Agın, M.; Devecioglu, E.G.; Demirbilek, H.; Özbek, M.N. Frequency of celiac disease and spontaneous normalization rate of celiac serology in children and adolescent patients with type 1 diabetes. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* **2021**, *13*, 72–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Mensted, M.Ø.; Falck, N.D.; Pedersen, K.; Buschard, K.; Holm, L.J.; Haupt-Jørgensen, M. Intestinal permeability in type 1 diabetes: An updated comprehensive overview. *J. Autoimmun.* **2021**, *122*, 102674. [[CrossRef](#)]
25. Li, X.; Atkinson, M.A. The role for gut permeability in the pathogenesis of type 1 diabetes—A solid or leaky concept? *Pediatr. Diabetes* **2015**, *16*, 485–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Vaarala, O. Leaking gut in type 1 diabetes. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2008**, *24*, 701–706. [[CrossRef](#)]

27. Sapone, A.; de Magistris, L.; Pietzak, M.; Clemente, M.G.; Tripathi, A.; Cucca, F.; Lampis, R.; Kryszak, D.; Carteni, M.; Generoso, M.; et al. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes* **2006**, *55*, 1443–1449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Leiva-Gea, I.; Sánchez-Alcoholado, L.; Martín-Tejedor, B.; Castellano-Castillo, D.; Moreno-Indias, I.; Urda-Cardona, A.; Tinahones, F.J.; Fernández-García, J.C.; Queipo-Ortuño, M.I. Gut microbiota differs in composition and functionality between children with type 1 diabetes and mody2 and healthy control subjects: A case-control study. *Diabetes Care* **2018**, *41*, 2385–2395. [[CrossRef](#)]
29. Wood-Heickman, L.K.; DeBoer, M.D.; Fasano, A. Zonulin as a potential putative biomarker of risk for shared type 1 diabetes and celiac disease autoimmunity. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2020**, *36*, e3309. [[CrossRef](#)]
30. Hoffmanová, I.; Sánchez, D.; Hábová, V.; Anděl, M.; Tučková, L.; Tlaskalová-Hogenová, H. Serological markers of enterocyte damage and apoptosis in patients with celiac disease, autoimmune diabetes mellitus and diabetes mellitus type 2. *Physiol. Res.* **2015**, *64*, 537–546. [[CrossRef](#)]
31. Duan, Y.; Prasad, R.; Feng, D.; Beli, E.; Li Calzi, S.; Longhini, A.L.F.; Lamendella, R.; Floyd, J.L.; Dupont, M.; Noothi, S.K.; et al. Bone marrow-derived cells restore functional integrity of the gut epithelial and vascular barriers in a model of diabetes and ACE2 deficiency. *Circ. Res.* **2019**, *125*, 969–988. [[CrossRef](#)]
32. Bosi, E.; Molteni, L.; Radaelli, M.G.; Folini, L.; Fermo, I.; Bazzigaluppi, E.; Piemonti, L.; Pastore, M.R.; Paroni, R. Increased intestinal permeability precedes clinical onset of type 1 diabetes. *Diabetologia* **2006**, *49*, 2824–2927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Aljada, B.; Zohni, A.; El-Matary, W. The gluten-free diet for celiac disease and beyond. *Nutrients* **2021**, *13*, 3993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Yoosuf, S.; Makharia, G.K. Evolving therapy for celiac disease. *Front. Pediatr.* **2019**, *7*, 193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lerner, A.; Freire de Carvalho, J.; Kotrova, A.; Shoenfeld, Y. Gluten-free diet can ameliorate the symptoms of non-celiac autoimmune diseases. *Nutr. Rev.* **2021**, nuab039. [[CrossRef](#)]
36. Haupt-Jørgensen, M.; Holm, L.J.; Josefsen, K.; Buschard, K. Possible prevention of diabetes with a gluten-free diet. *Nutrients* **2018**, *10*, 1746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kaur, P.; Agarwala, A.; Makharia, G.; Bhatnagar, S.; Tandon, N. Effect of gluten-free diet on metabolic control and anthropometric parameters in type 1 diabetes with subclinical celiac disease: A randomized controlled trial. *Endocr. Pract.* **2020**, *26*, 660–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article

Selected Serum Markers Associated with Pathogenesis and Clinical Course of Type 1 Diabetes in Pediatric Patients—The Effect of Disease Duration

Agnieszka Ochocińska ^{1,*}, Marta Wysocka-Mincewicz ², Jolanta Świdorska ² and Bożena Cukrowska ³

¹ Department of Biochemistry, Radioimmunology and Experimental Medicine, The Children's Memorial Health Institute, Aleja Dzieci Polskich 20, 04-730 Warsaw, Poland

² Clinic of Endocrinology and Diabetology, The Children's Memorial Health Institute, Aleja Dzieci Polskich 20, 04-730 Warsaw, Poland

³ Department of Pathomorphology, The Children's Memorial Health Institute, Aleja Dzieci Polskich 20, 04-730 Warsaw, Poland

* Correspondence: a.ochocinska@poczd.pl; Tel: +48-22-815-73-01

Abstract: Biochemical abnormalities in the course of type 1 diabetes (T1D) may cause the production/activation of various proteins and peptides influencing treatment and causing a risk of complications. The aim of this study was to assess concentrations of selected serum substances involved in the pathogenesis and course of T1D and to correlate their concentrations with the duration of T1D. The study included patients with T1D ($n = 156$) at the age of 3–17, who were divided according to the duration of the disease into those newly diagnosed ($n = 30$), diagnosed after 3–5 ($n = 77$), 6–7 ($n = 25$), and over 7 ($n = 24$) years from the onset of T1D, and age-matched healthy controls ($n = 30$). Concentrations of amylin (IAPP), proamylin (proIAPP), catestatin (CST), chromogranin A (ChgA), nerve growth factor (NGF), platelet-activating factor (PAF), uromodulin (UMOD), and intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) were measured in sera using immunoenzymatic tests. There were significant differences in concentrations of all the substances except UMOD and NGF between T1D patients and healthy children. The duration of the disease affected concentrations of CST, ChgA, PAF, and NGF, i.e., proteins/peptides which could have an impact on the course of T1D and the development of complications. In long-term patients, a decrease in concentrations of CST and ChgA, and an increase in PAF concentrations were found. In the case of NGF, a decrease was observed after the initial high values, followed by an increase over 7 years after T1D diagnosis. Concluding, the results show that concentrations of selected serum indicators may change in the course of T1D. Further studies are needed to establish whether these indicators could be used in the context of predicting long-term complications.

Keywords: markers; type 1 diabetes; disease duration; metabolic memory



Citation: Ochocińska, A.; Wysocka-Mincewicz, M.; Świdorska, J.; Cukrowska, B. Selected Serum Markers Associated with Pathogenesis and Clinical Course of Type 1 Diabetes in Pediatric Patients—The Effect of Disease Duration. *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 2151. <https://doi.org/10.3390/jcm12062151>

Academic Editor: Marco Meloni

Received: 14 January 2023

Revised: 24 February 2023

Accepted: 6 March 2023

Published: 9 March 2023



Copyright © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Type 1 diabetes mellitus (T1D)—one of the most widespread diseases of our time—is a chronic disease that results from the autoimmune destruction of insulin-producing β -cells in the islets of Langerhans in the pancreas [1]. By 2022 there were 8.75 million individuals worldwide with T1D (119,995 in Poland), 1.52 million (15,220 in Poland) were younger than 20 years of age [2]. Looking at worldwide data, 530,000 new cases of T1D were diagnosed across all ages, of which 201,000 were under the age of 20. Therefore, the scale of the problem is very large [2]. The discovery and development of more physiologically active insulins applied together with continuous subcutaneous infusion pumps, and the improvement of T1D care contributed to a significant extension of T1D patients' life span and quality. However, untreated or improperly treated disease causes many complications, both acute and chronic [3,4]. Pathogenesis of T1D has not been fully elucidated so far,

and factors inducing the disease are still the subjects of many studies [5]. It is already known that great importance in the pathogenesis of diabetic complications is not only the current metabolic control but also the careful and intensive treatment of the disease from the moment of its diagnosis [6].

It is proven that changes in metabolic control, in any of the stages of the diabetes course, influence complication risks in the future, even after 20–30 years of the duration of the disease. This phenomenon, called “metabolic memory”, is probably the consequence of an increase in oxidative stress factors caused by hyperglycemia, is partly irreversible, and persists even after normalization of glycemia [7].

Abnormal glucose concentrations and metabolites generated as a result of excess hormones activate many unfavorable metabolic processes (non-enzymatic glycation of proteins, changes of the polyol and hexosamine pathways, activation of protein kinase C, oxidative stress, and tissue hypoxia). These pathological pathways lead to the failure of various organs, especially the eyes, kidneys, nerves, heart, and blood vessels. Disturbances in growth (short height or overgrowth) and puberty (premature or delayed puberty) can also be other types of T1D complications in children [8]. Late complications in the first 5 years of diabetes in both pediatric and adult patients are sporadic, but their number increases with the duration of the disease. Macrovascular changes usually manifest themselves clinically after the onset of microangiopathic changes, especially in diabetic nephropathy. However, before the clinical manifestation of structural changes in the vessels, functional changes in the microcirculation occur first. These changes are reversible, and therefore early markers are being sought to identify the early stages of biochemical disorders preceding endothelial dysfunction [6,8].

There are still no tools for diagnosing these early stages of the development of late complications, but only for the stages of functional changes preceding the appearance of permanent structural changes visible in imaging tests. Despite the availability of high-performance omics technologies, data inconsistency and a lack of unambiguous, highly promising protein markers are observed [9,10]. Postulated glycemic control refers to keeping blood glucose levels as close to the normal range as possible in order to prevent acute and chronic complications that would result from living with glucose levels significantly above or below the desired range. In practice, it can be achieved by measuring fasting blood glucose or using glycosylated hemoglobin (HbA1c), a measurement of average blood glucose, over about three months. Currently, HbA1c has also been presented to play the role of an indicator of disease progression in diabetes. HbA1c has been shown to be directly related to the survival of patients with an approximately 30-year history of T1D [11]. However, it is known that HbA1c is not an ideal indicator of metabolic control [12–14].

Therefore, the aim of our study was to assess concentrations of selected active substances such as proteins, peptides, hormones, and others, the participation of which in the pathogenesis and course of diabetes and its complications is known or postulated, and to correlate concentrations of these indicators to the duration of T1D, as well as to compare these concentrations to those of a healthy population. We analyzed the levels of islet amyloid polypeptide/amylin (IAPP) and its prohormone—proamylin (proIAPP)—substances influencing the mechanisms of carbohydrate metabolism [15–18]; chromogranin A (ChA)—a supposed autoantigen in T1D [19–21]; and the product of its proteolysis catesstatin (CST) [22,23], intestinal fatty acid binding protein (I-FABP)—a protein responsible for increased permeability of intestinal epithelial cells, showed to be increased in children with T1D [24]. We also included in our analysis substances potentially evaluable as indicators of late complications, neurological—nerve growth factor (NGF) [25], and vascular—platelet-activating factor (PAF) [26,27]. Finally, we assessed uromodulin, a protein secreted by the cells of the distal nephron tubules, strongly correlated with eGFR, which could be related to diabetic nephropathy in T1D patients [28].

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Study Design

The study included 156 patients with T1D whose median age was 11 years of age (range: 3–17); 60 (46.6%) boys and 66 (52.4%) girls that were hospitalized at the Clinic of Endocrinology and Diabetology of the Children’s Memorial Health Institute in Warsaw. T1D was diagnosed according to the recommendations of the International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes [29,30]. Routine serological tests were performed in The Central Laboratory (glucose, HbA1c) and in The Department of Biochemistry, Radioimmunology and Experimental Medicine (peptide-C, anti-glutamic decarboxylase (anti-GAD), anti-tyrosine phosphatase (anti-IA2), and anti-islet cell (ICA) antibodies) at the Children’s Memorial Health Institute. At least 2 autoantibodies (anti-GAD, anti-IA2, or ICA) were positive in T1D patients. T1D patients with current inflammation, hypoxia, and coexisting diseases were excluded from the study. A detailed biochemical status of the T1D patients is presented in Table 1. We have not observed the relationship of presented biochemical parameters with selected active substances assessed in this study (the analysis of the value of all r indicators in Spearman’s correlation analysis was <0.2).

Table 1. Biochemical status of T1D subgroups depending on the T1D duration.

Parameters	T1D (n = 156) ^a	Newly Diagnosed (n = 30) ^b	Disease Duration (in Years)		
			3–5 (n = 77) ^c	6–7 (n = 25) ^d	>7 (n = 24) ^e
Blood glucose (mg/dL)	266 (75.6–792)	337 (153–792)	243 (119–640)	221 (144–569)	311 (75.6–512)
Glycated hemoglobin (%)	7.80 (5.90–18.8)	12.8 (6.60–18.8)	7.40 (6.10–14.3)	7.10 (5.90–10.5)	8.00 (5.9–11.5)
Serum peptide-C (ng/mL)	0.50 (0.06–3.78)	0.51 (0.30–3.22)	0.54 (0.20–3.78)	0.49 (0.19–2.15)	0.38 (0.06–0.88)
Serum insulin (mIU/L)	4.14 (2.00–21.9)	4.90 (3.39–21.9)	3.87 (2.00–11.9)	4.34 (3.00–7.34)	3.56 (2.00–6.89)
Serum total cholesterol (mg/dL)	158 (85.0–323)	156 (110–210)	159 (85.0–257)	168 (117–260)	159 (105–323)
Serum triglycerides (mg/dL)	70.0 (33.0–244)	86.0 (40.0–150)	61.0 (33–244)	77.0 (40–214)	73.0 (49.0–194)
Serum HDL cholesterol (mg/dL)	61.6 (23.5–115)	48.0 (23.5–99.5)	64.5 (26.2–98.5)	62.8 (40.4–90.2)	60.7 (47.7–115)
Serum LDL cholesterol (mg/dL)	82.5 (32.5–474)	88.5 (45.9–152)	82.2 (32.5–145)	90.0 (46.1–163)	76.3 (40.7–474)
Serum non-HDL cholesterol (mg/dL)	98.5 (41.9–267)	103 (57.9–168)	94.6 (41.9–186)	105 (55.1–194)	90.7 (50.5–267)
Serum CRP (mg/dL)	0.04 (0.03–0.53)	0.08 (0.03–0.48)	0.04 (0.03–0.53)	0.05 (0.03–0.15)	0.04 (0.03–0.11)
Serum vitamin D (ng/mL)	27.9 (10.1–66.1)	29.5 (11.5–42.3)	29.5 (15.5–66.1)	25.3 (10.1–39.7)	26.2 (13.0–41.9)
Serum creatinine (mg/dL)	0.57 (0.23–1.05)	0.47 (0.23–0.85)	0.56 (0.33–1.01)	0.66 (0.38–1.05)	0.72 (0.47–1.05)

T1D—type 1 diabetes, n—sample size, HDL—high density lipoprotein, LDL—low density lipoprotein, CRP—c-reactive protein. Results are expressed as median and range (in brackets). Differences in the concentrations of the tested parameters between the groups significant at $p < 0.05$: blood glucose: ^a vs. ^b, ^b vs. ^c, and ^b vs. ^d; glycated hemoglobin: ^a vs. ^b, ^b vs. ^c, ^b vs. ^d, and ^b vs. ^e; serum insulin: ^a vs. ^b, ^b vs. ^c, and ^b vs. ^e; HDL: ^a vs. ^b, ^b vs. ^c, ^b vs. ^d, and ^b vs. ^e; serum triglycerides: ^a vs. ^b and ^b vs. ^c; serum creatinine: ^a vs. ^b, ^b vs. ^c, ^b vs. ^d, ^b vs. ^e, and ^c vs. ^e.

The T1D group consisted of 30 patients (17 girls and 13 boys) with newly diagnosed T1D (duration of diabetes < 3 months, at least one week after correcting the acid-base imbalance, i.e., normalization of blood gas results), and 126 patients (66 girls and 60 boys) with T1D lasting more than 3 years (median duration—5 years, range: 3–14). The group of long-term patients was divided according to how long it had been since onset in the follow-

ing way: patients with no expected complications (first 3–5 years of disease; $n = 77$; 15 girls and 62 boys), patients with expected first biochemical changes indicating complications (6–7 years of disease, $n = 25$; 13 girls and 12 boys), and patients in which complications are highly probable (patients > 7 years of disease, $n = 24$; 13 girls and 11 boys). All of the patients included in the study had no documented neuropathy, hypertension, or retinopathy on the day of performing the biochemical analysis.

The control group consisted of 30 apparently healthy children (14 girls and 16 boys) at a median age of 8 years (range: 4–17 years) with no history of diabetes diagnosis and with the same exclusion criteria as the study group (no comorbidities of other causes, no signs of present inflammation, no clinically significant anemia, and no signs of hypoxia).

2.2. Methods

All active substances were assessed using the enzyme immunoassay ELISA (IAPP, proIAPP, NGE, ChgA, PAF—Cloud Clone Corp, Katy, USA; CTS—RayBio, Norcross, USA; UMOD—BioVendor, Brno, Czech Republic; I-FABP—Hycult Biotech Inc., Wayne, PA, USA) according to the test manufacturer's instructions. The remaining biochemical tests, including HbA1c, were assessed by routine laboratory methods (Abbott Alinity ci-series assays).

2.3. Statistical Analysis

The minimum sample size was estimated at 86 participants using Epi Info 7 (available at: <https://www.cdc.gov/epiinfo/index.html>; accessed on 1 February 2023). Data were analyzed using Statistica v.10.0 software (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Standard deviations of means were used as descriptive statistics. Normal distribution was checked using the Shapiro–Wilk test and revealed a non-normal distribution of data. Differences between two independent groups were tested by the Mann–Whitney U test and between three or more subgroups by Kruskal–Wallis ANOVA by Ranks for independent groups. Correlation analysis was done with the use of the Spearman rank correlation test. If the differences were significant, post hoc analysis using the Dunn–Bonferroni test was then performed. In all tests, p -values < 0.05 were considered significant.

2.4. Ethical Approval

The study was approved by the Local Ethics Committee from the Children's Memorial Health Institute (18/KBE/2019, date of approval: 24 April 2019) with the written informed consent obtained from participants over 16 years of age and/or their legal representative, as appropriate.

3. Results

3.1. Patient Characteristics

The subgroups distinguished on the basis of the duration of the disease statistically differed significantly ($p < 0.05$) in terms of biochemical parameters reflecting carbohydrate metabolism (glucose, HbA1C, insulin), lipid metabolism (HDL cholesterol and triglycerides), as well as reflecting kidney function (creatinine).

In the case of blood glucose and HbA1C, the highest concentrations were observed in newly diagnosed patients. With the duration of the disease, as a result of the implemented treatment, their concentrations decreased. However, after 7 years after the T1D diagnosis, an increase in the concentrations of both parameters was observed. Statistically significant differences between individual groups are listed in Table 1. Despite statistically significant differences between insulin concentrations in individual subgroups, all values were within the reference range of 4–16 mIU/L.

Lipid profiles, regardless of the T1D duration, were within the target values recommended in the current recommendations [29]. In the case of HDL cholesterol and triglycerides, the values changed among T1D subgroups reaching a statistically significant difference, but without clinical significance.

Similarly, in the case of creatinine, statistically significant changes between the subgroups were not clinically significant.

3.2. Concentrations of the Selected Active Substances in T1D Patients and Healthy Controls

Except for UMOD and NGF levels, concentrations of tested substances were statistically significantly higher in the T1D group compared with the control group (Table 2). In the case of NFG, the differences between T1D and control groups were not significant, but the *p*-value was at the level of the statistical trend (*p* = 0.056). This trend was confirmed by a later analysis in more detailed subgroups (new cases vs. patients with long-term disease) (Figure 1).

Table 2. Concentrations of selected active substances in T1D patients and healthy controls.

	T1D (<i>n</i> = 156)	T1D—Newly Diagnosed (<i>n</i> = 30)	T1D > 3 Years from Diagnosis (<i>n</i> = 126)	HC (<i>n</i> = 30)
IAPP [pg/mL]	75.0 (6.16–499) <i>p</i> < 0.000001	60.1 (17.3–148) <i>p</i> < 0.0000001	65.0 (6.16–499) <i>p</i> = 0.000005	33.5 (16.9–49.1)
		* <i>p</i> = 0.697		
proIAPP [pg/mL]	155 (34.8–958) <i>p</i> < 0.000001	99.6 (34.8–258) <i>p</i> < 0.0000001	92.6 (42.10–958) <i>p</i> = 0.000021	57.6 (19.5–82.3)
		* <i>p</i> = 0.513		
CST [ng/mL]	20.3 (0.001–305) <i>p</i> < 0.000001	35.2 (0.001–70.1) <i>p</i> = 0.003	20.1 (0.001–305) <i>p</i> = 0.617	20.2 (0.003–21.5)
		* <i>p</i> = 0.516		
ChgA [ng/mL]	55.7 (15.5–104) <i>p</i> < 0.000001	74.5 (40.5–98.5) <i>p</i> = 0.005	74.5 (40.5–98.5) <i>p</i> = 0.123	34.5 (11.5–88.0)
		* <i>p</i> < 0.000001		
NGF [pg/mL]	15.2 (0.52–804) <i>p</i> = 0.056	12.7 (3.45–17.9) <i>p</i> = 0.000004	4.69 (0.52–804) <i>p</i> = 0.036	4.30 (3.03–37.9)
		* <i>p</i> = 0.003		
PAF [ng/mL]	0.37 (0.11–5.18) <i>p</i> < 0.000001	0.20 (0.11–0.43) <i>p</i> = 0.588	0.25 (0.12–5.18) <i>p</i> = 0.194	0.19 (0.11–1.83)
		* <i>p</i> = 0.00001		
UMOD [ng/mL]	287 (39.0–875) <i>p</i> = 0.847	305 (90.5–610) <i>p</i> = 0.796	297 (39.0–875) <i>p</i> = 0.440	278 (51.0–555)
		* <i>p</i> = 0.601		
I-FABP [pg/mL]	970 (130–4560) <i>p</i> < 0.000001	1015 (280–2990) <i>p</i> = 0.000095	955 (130–4560) <i>p</i> = 0.000001	485 (170–2730)
		* <i>p</i> = 0.857		

T1D—type 1 diabetes, HC—healthy control, IAPP—amylin/islet amyloid polypeptide, proIAPP—proamylin/proislet amyloid polypeptide, CST—catestatin, ChgA—chromogranin A, NGF—nerve growth factor, PAF—platelet activating factor, UMOD—uromodulin, I-FABP—intestinal fatty acid binding protein, *p*—probability value between T1D patients and healthy controls, * *p*—probability value between newly diagnosed T1D patients and T1D patients treated >3 years, and *p* < 0.05 was statistically significant; results are expressed as median and range (in brackets).

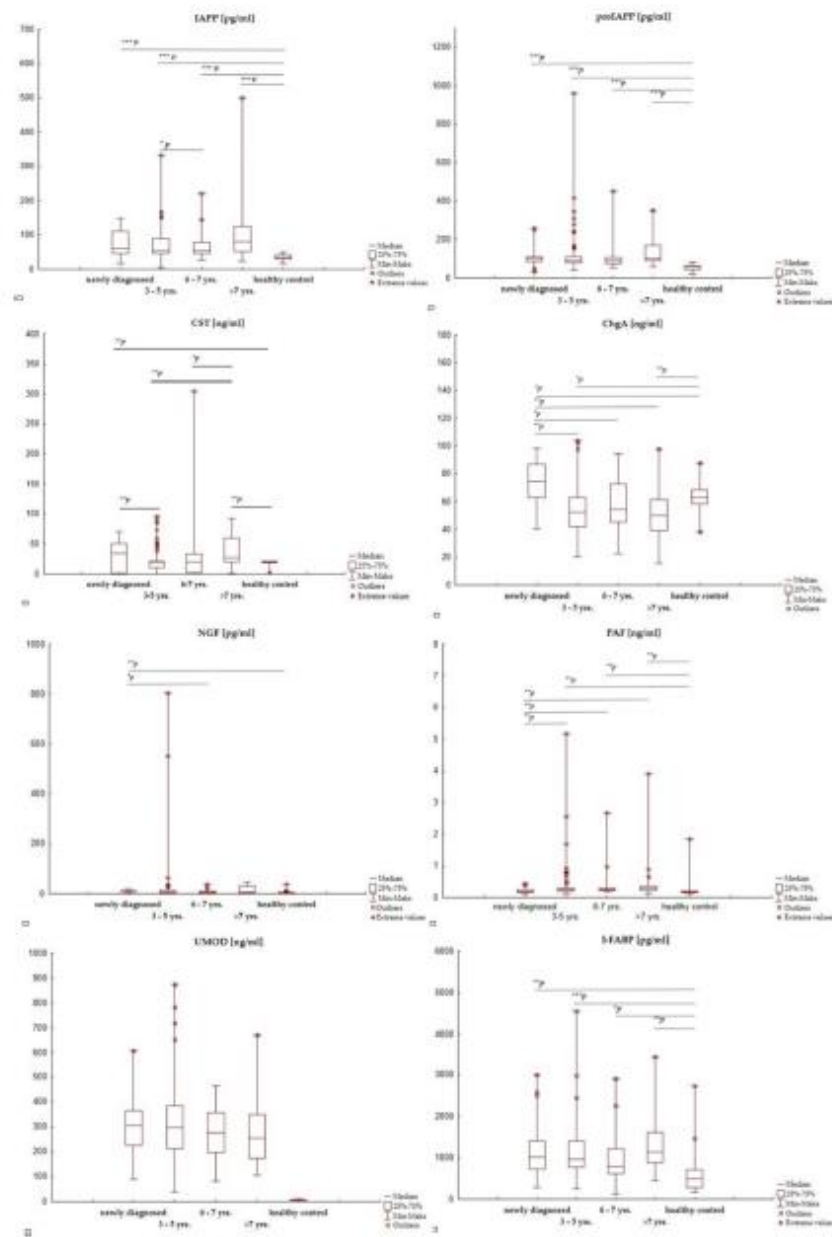


Figure 1. Selected active substances in T1D patients with different disease duration and healthy controls. IAPP—amylin/islet amyloid polypeptide, proIAPP—proamylin/proislet amyloid polypeptide, CST—catestatin, ChgA—chromogranin A, NGF—nerve growth factor, PAF—platelet-activating factor, UMOD—uromodulin, I-FABP—intestinal fatty acid binding protein, yrs.—years, * p —probability value ≤ 0.05 , ** p —probability value ≤ 0.001 , and *** p —probability value ≤ 0.000001 .

When the levels of tested substances in children with newly diagnosed T1D were compared with the group of children with T1D treated for at least 3 years, it was shown that the duration of T1D affected the levels of NGF, ChgA, and PAF.

The levels of PAF were significantly lower in newly diagnosed T1D compared with patients with T1D duration > 3 years: 0.20 (0.11–0.43) vs. 0.25 (0.12–5.18) ng/mL. In contrast, NGF and ChgA levels were significantly higher in newly diagnosed patients than in those treated over 3 years: 12.7 (3.45–17.9) vs. 4.69 (0.52–804) pg/mL for NGF and 74.5 (40.5–98.5) vs. 52.5 (15.5–104) ng/mL for ChgA, respectively).

3.3. The Effect of Disease Duration on the Selected Active Substances' Concentrations in T1D Children

As we observed differences in T1D subgroups with shorter and longer disease duration, the whole T1D group was divided into three smaller ones (3–5 years, 6–7 years, and >7 years) and then reanalyzed. Figure 1 illustrates the differences between concentrations of active substances in these subgroups, the healthy control group, and the newly diagnosed patients. Detailed numerical data (median and range) and exact *p*-values are presented in the Supplementary Table S1.

No effect of disease duration on IAPP, prolAPP, and I-FABP levels was observed, but concentrations of each substance statistically differed significantly between the T1D patients (in each subgroup) and the control group, except for UMOD. In contrast, concentrations of CST, ChgA, PAF, and NGF were statistically significantly influenced by the time that had passed since the diagnosis, but the direction of changes depended on the type of biomarker.

In the case of ChgA—the highest concentrations were observed in patients just after the diagnosis of T1D (median 74.5 ng/mL, range 40.5–98.5) and they statistically differed significantly both from the control group (34.5 ng/mL, *p* = 0.005) and the groups of patients treated for 3–5 years (52.5 ng/mL, *p* = 0.0001), 6–7 years (54.5 ng/mL, *p* = 0.0005, and >7 years (50.3 ng/mL, *p* = 0.000009). With the duration of the disease, ChgA concentration decreased, and in each time interval, it was statistically significantly lower compared to newly diagnosed patients.

Although serum CST concentration did not differ between newly diagnosed T1D patients, with a median of 35.2 ng/mL (range 0.001–70.1), and those treated > 3 years, with a median of 20.1 ng/mL (range 0.001–305), the detailed analysis in subgroups of long-term patients showed the possible effect of disease duration. The highest concentrations of CST were observed in patients with newly diagnosed T1D; CST levels decreased in patients treated for 3–7 years, but 7 years after diagnosis, high values of the biomarker were observed again (Table S1). Statistically significant differences were observed between newly diagnosed patients and those treated for 3–5 years: *p* = 0.0008, median 35.2 ng/mL (range 0.000–70.1) vs. 19.7 ng/mL (0.007–95.6), patients treated for 3–5 years and patients treated for >7 years: *p* = 0.0008, median 19.7 ng/mL (0.007–95.6) vs. 27.0 ng/mL (1.45–92.3), and the group treated for 6–7 years and those treated for >7 years: *p* = 0.019, median 20.0 ng/mL (0.005–305) ng/mL vs. 27.0 (1.45–92.3) ng/mL.

In the case of PAF, patients with longer disease duration had higher concentrations of this substance (Figure 1, Table S1). A statistically significant difference (*p* < 0.05) was observed in the subgroups treated for 3–5 years (median 0.24 ng/mL, range 0.12–5.18), 6–7 years (median 0.25 ng/mL, range 0.18–2.67), and >7 years (median 0.29 ng/mL, range 0.12–3.9) in relation to those with newly diagnosed T1D (median 0.20 ng/mL, range 0.11–0.43).

The highest NGF concentration was observed in newly diagnosed patients: 12.7 pg/mL (3.45–17.9), followed by a decrease of values for patients treated for 3–5 years: 4.49 pg/mL (1.09–804), 6–7 years: 4.49 pg/mL (0.52–37.5), and after 7 years from diagnosis: 6.21 pg/mL (0.52–45.8). A statistically significant difference was observed only in patients newly diagnosed—in relation to the control group (*p* = 0.000004) and those who had been ill for 6–7 years (*p* = 0.002).

4. Discussion

In a number of studies, selected biologically active substances were indicated as contributing to the etiology (IAPP [16,31–36], proIAPP [17,18,37], I-FABP [24]), course (CST [38,39], ChgA [40–42]) or the development of various complications (neuropathy—NGF [43–45], cardiovascular complications—PAF [26,46,47], and cardiovascular complications and nephropatia—UMOD [28,48,49]). In the current study, we assessed the diagnostic usefulness of these indicators present in T1D patients' sera and confirmed statistically significant differences between their concentrations in the group of children with T1D and healthy children, but only some of them (NGF, ChgA, CST and PAF) were affected by disease duration. To the best of our knowledge, no one has analyzed concentrations of IAPP, proIAPP, CST, ChgA, NGF, PAF, UMOD, and I-FABP in the context of T1D duration. Our study showed that among the selected indicators, only UMOD did not show statistically significant differences between children with T1D and healthy children, but we found that UMOD levels in T1D patients were associated with serum creatinine concentration ($r = -0.477, p < 0.005$). Thus, this could suggest that UMOD should be rather assessed in urine than in the sera of T1D patients.

Disease duration had no effect on IAPP and its precursor—proIAPP, as well as I-FABP, although the levels of these indicators were significantly higher in the sera of T1D patients compared to healthy children. An increased level of mature IAPP in the T1D group is opposite to results presented by Courtade et al. [17], but, like this researcher, we observed an elevated ratio of proIAPP to mature IAPP, which clearly indicates impaired proIAPP processing. It seems likely that IAPP aggregates, by inducing islet inflammation, may be a trigger or accelerator of autoimmunity in T1D. It is known that early prefibrillary aggregates that are difficult to observe histologically, may be present in the early stage of the disease, and the inflammatory properties of IAPP aggregates may play a role in the pathology of T1D [17,33,36,50].

Significantly elevated I-FABP levels in T1D patients, independent of disease duration, confirm our previous reports on epithelial damage in pediatric T1D and the utility of I-FABP as a serological marker of intestinal barrier dysfunction [24]. It is noteworthy that those substances whose concentration was not affected by the duration of the disease (IAPP, proIAPP, and I-FABP) are markers described as taking part in the pathomechanism of T1D.

Contrary to this observation, the concentrations of CST, ChgA, PST, and NGF varied in patients at different times since the onset of T1D. We did not observe one specific trend for all the indicated substances. This finding confirms previous reports showing that these substances could be associated with the T1D course and various late complications [26,38–47].

Our data on ChgA are consistent with the reports identifying ChgA as an autoantigen in T1D [19,51], and suggesting that altered ChgA levels may reflect changes in β -cell integrity [52]. Auto-reactive T cells targeting β -cell antigens are known to play a key role in β -cell destruction in T1D [53]. In this context, ChgA as an autoantigen localized in β -cell granules seems to be an attractive target for autoimmune reactions. Determination of ChgA concentration in patients' sera may therefore potentially serve as an important biomarker of prediabetes. The highest concentration of ChgA observed by us in children with newly diagnosed T1D was also indicated by Xu et al. in adult T1D patients [52]. They reported that regular oral administration of verapamil in adult patients with T1D resulted in a decrease in ChgA levels, which remained at lower levels during treatment, and elevated levels of ChgA at the onset of the disease did not change in people from the control group who did not take verapamil. Our results in the group of healthy children are also consistent with their report, in which the level of ChgA in the serum of the healthy control group was about two times lower compared to those with T1D. Results opposite to our observations were obtained by Herold et al. [40], but it is worth noting that the researchers showed only a small but constant increase ($p = 0.0410$) in the level of ChgA depending on the duration of T1D. However, it should be noted that in this study, the duration of T1D in included patients was markedly longer (average 13.5 years) than in patients involved in our analysis. In addition, T1D patients with high levels of ChgA had

enterochromaffin-like cell hyperplasia or autoimmune gastritis, i.e., conditions that were not found in the T1D children analyzed in our study. We speculate whether the lower concentrations observed in patients treated for more than 3 years are due to the breakdown of ChgA into protein cleavage products. The conditions under which ChgA decomposes are not fully known and described. Therefore, it would be worth assessing the concentration of other biologically active peptides, the precursor of which is ChgA: pancreastatin, WE-14, serpinin, and chromofungin [54,55]. Beta granule proteins (like ChgA) should not normally elicit an immune response, thus aberrant post-translational modification of the peptides is a possible hypothesis for how β -cell self-antigens are generated.

Unlike ChgA, there are no clear data on CST in T1D. It is known that CST is critical to maintaining metabolic and immune homeostasis by regulating immune cell infiltration and macrophage differentiation [56]. In addition, according to Ying et al., CST may be able to control hepatic glucose production, improve sensitivity to insulin, and have direct anti-inflammatory effects [57]. In our study, CST concentrations were statistically significantly higher in T1D patients than in the group of healthy people. Thus, this is in contrast to the observation of decreased CST levels in T2D patients previously reported by the researchers [57–59]. It should be emphasized, however, that the pathomechanism of both types of diabetes is different, and T1D should rather be compared with other autoimmune diseases. In this context, our results on CST concentrations during T1D are consistent with those shown in other autoimmunology diseases—inflammatory bowel disease [60]. In our study, the highest concentrations of CST were observed in patients with newly diagnosed T1D and those treated for more than 7 years. In patients who had been ill for more than 3 years but less than 7 years CST concentrations decreased. It would be desirable to investigate more closely whether the observed elevated levels in children with T1D are a compensatory mechanism for disturbances in glycemic homeostasis.

In the case of PAF, we showed that its concentrations were significantly higher in T1D patients who were ill for over 3 years compared to newly diagnosed patients, and this result is in line with other authors indicating that an increased level of PAF may indicate vascular complications in T1D patients. Cavallo-Perin et al. observed elevated PAF levels in patients with T1D and microalbuminuria, i.e., a manifestation of extensive vascular damage, and they suggested that PAF can be an indicator of micro- and macroangiopathy [46]. Nathan et al. indicate that elevated PAF levels may perpetuate hyperglycemia and promote or exacerbate micro- or macrovascular complications in T1D patients [26]. Ersoy et al. also emphasize that the high level of PAF detected in their study in T1D patients with long-term diabetes, compared to the group of healthy people, may be associated with vascular complications [47]. Since vascular complications are observed after many years of diabetes, and our pediatric patients did not present clinical vascular complications we suggest that PAF could be useful as a marker of early micro- and macrovascular changes in the course of T1D in children. However, further studies on T1D in children are needed to confirm this relationship.

We also presented that the concentrations of NGF are influenced by T1D duration. The high NGF levels in newly diagnosed children can be explained by a stress-induced increase [61], and this result is in line with the observations of other researchers [62]. However, it should be emphasized that the observed decrease in NGF levels in the course of diabetes cannot be clearly interpreted. Many authors show that neurological complications induce a drop in serum NGF concentration [43–45]. It was shown that patients with T2D and neurological complications had lower levels of NGF compared to those without complications [63]. Moreover, there is no clear position on the NGF reference ranges for a healthy population. The concentrations described in the literature range from a few [64,65] to several dozen pg/mL [61,66,67]. Therefore, it is important to establish the norms of NGF for children and further research on this peptide.

5. Limitations and Strengths

To the best of our knowledge, this is the first study analyzing concentrations of IAPP, proIAPP, CST, ChgA, NGF, PAF, UMOD, and I-FABP in relation to diabetes duration in a pediatric population.

However, we are aware that results should be interpreted with caution due to the relatively small amount of data on the concentrations of selected substances in the population of a healthy population. Due to the lack of these data, it is difficult to compare the obtained concentrations in the group of patients, especially since the literature reports are often contradictory. Evidently further studies are necessary in order to confirm the role of study indicators in the pathophysiology and course of T1D.

We recognize that the presented results would be more accurate if we were able to observe patients over a longer period of time. In order to confirm our suggested conclusions, we plan to follow the patients participating in this study and perform the same tests again before our patients are 18 years of age.

Exciting new questions and new answers may arise when we additionally analyze the tested substances in relation to glycemic control or biochemical parameters.

6. Conclusions

The current study presented that concentrations of selected serum substances such as CST, ChgA, NGF, and I-FABP, prohormones/hormones (IAPP, proIAPP), and other active substances (PAF) differ between T1D patients and healthy controls. The level of some of them (CST, ChA, PAF, and NGF) have been shown to be dependent on the duration of T1D. However, further research is needed to confirm the role of these indicators in clinical practice, in particular in terms of using them as biomarkers in the course of diabetes in children and predicting long-term complications.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm12062151/s1>, Table S1: Selected markers in T1D patients with different disease duration and healthy controls—concentrations and significance of differences.

Author Contributions: Conceptualization, A.O. and B.C.; methodology, A.O., B.C. and M.W.-M.; validation, A.O. and B.C.; formal analysis, B.C.; investigation, A.O.; resources, M.W.-M. and J.S.; data curation, A.O. and J.S.; writing—original draft preparation, A.O.; writing—review and editing, B.C. and M.W.-M.; visualization, A.O.; supervision, B.C. and M.W.-M.; funding acquisition, A.O. and B.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by The Children's Memorial Health Institute, grant number: M41/19.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of The Children's Memorial Health Institute (protocol code: 18/KBE/2019, date of approval: 24 April 2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent was obtained from the patient(s) to publish this paper.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy protections.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Del Chierico, E.; Rapini, N.; Deodati, A.; Matteoli, M.C.; Cianfarani, S.; Putignani, L. Pathophysiology of Type 1 Diabetes and Gut Microbiota Role. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 14650. [CrossRef]
2. IDF. *IDF Diabetes Atlas*, 10th ed.; IDF: Brussels, Belgium, 2022; Available online: <https://Diabetesatlas.Org/> (accessed on 1 February 2023).

3. Cusick, M.; Meleth, A.D.; Agrón, E.; Fisher, M.R.; Reed, G.F.; Knatterud, G.L.; Barton, F.B.; Davis, M.D.; Ferris, F.L.; Chew, E.Y.; et al. Associations of Mortality and Diabetes Complications in Patients with Type 1 and Type 2 Diabetes: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report No. 27. *Diabetes Care* **2005**, *28*, 617–625. [CrossRef] [PubMed]
4. Karges, B.; Durinovic-Belló, L.; Heinze, E.; Debatin, K.-M.; Boehm, B.; Karges, W. Immunological Mechanisms Associated with Long-Term Remission of Human Type 1 Diabetes. *Diabetes/Metab. Res. Rev.* **2006**, *22*, 184–189. [CrossRef] [PubMed]
5. Khosravi-Maharlooei, M.; Madley, R.; Borsotti, C.; Ferreira, L.M.R.; Sharp, R.C.; Brehm, M.A.; Greiner, D.L.; Parent, A.V.; Anderson, M.S.; Sykes, M.; et al. Modeling Human T1D-Associated Autoimmune Processes. *Mol. Metab.* **2021**, *56*, 101417. [CrossRef] [PubMed]
6. Yapanis, M.; James, S.; Craig, M.E.; O'Neal, D.; Ekinci, E.I. Complications of Diabetes and Metrics of Glycemic Management Derived From Continuous Glucose Monitoring. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2022**, *107*, e2221–e2236. [CrossRef] [PubMed]
7. Chen, Z.; Natarajan, R. Epigenetic Modifications in Metabolic Memory: What Are the Memories, and Can We Erase Them? *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2022**, *323*, C570–C582. [CrossRef]
8. Piona, C.; Ventrici, C.; Marcovecchio, L.; Chiarelli, F.; Maffei, C.; Bonfanti, R.; Rabbone, I. Long-Term Complications of Type 1 Diabetes: What Do We Know and What Do We Need to Understand? *Minerva Pediatr.* **2021**, *73*, 504–522. [CrossRef]
9. Yi, L.; Swensen, A.C.; Qian, W.-J. Serum Biomarkers for Diagnosis and Prediction of Type 1 Diabetes. *Transl. Res.* **2018**, *201*, 13–25. [CrossRef]
10. Bonifacio, E. Predicting Type 1 Diabetes Using Biomarkers. *Diabetes Care* **2015**, *38*, 989–996. [CrossRef]
11. Grauslund, J.; Jørgensen, T.M.M.; Nybo, M.; Green, A.; Rasmussen, L.M.; Sjølie, A.K. Risk Factors for Mortality and Ischemic Heart Disease in Patients with Long-Term Type 1 Diabetes. *J. Diabetes Its Complicat.* **2010**, *24*, 223–228. [CrossRef]
12. Cichocka, E.; Gumprecht, J. Is HbA1c the Only Choice? Alternative Biomarkers for Glycaemic Control Assessment. *Clin. Diabetol.* **2017**, *6*, 136–141. [CrossRef]
13. Sherwani, S.I.; Khan, H.A.; Ekhzaimy, A.; Masood, A.; Sakharkar, M.K. Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients. *Biomark Insights* **2016**, *11*, 95–104. [CrossRef] [PubMed]
14. Lyons, T.J.; Basu, A. Biomarkers in diabetes: Hemoglobin A1c, vascular and tissue markers. *Transl. Res.* **2012**, *159*, 303–312. [CrossRef] [PubMed]
15. Bronský, J.; Chada, M.; Kotaska, K.; Průša, R. Amylin—Its physiological role in humans. *Cesk. Fysiol.* **2002**, *51*, 176–180. [PubMed]
16. Otto-Buczowska, E.; Jarosz-Chobot, P.; Machnica, E. The Role of Amylin in Glucose Homeostasis Regulation and Possible Future Usage in Adolescents with Type 1 Diabetes. *Diabetol. Dost. I Klin.* **2009**, *9*, 41–45.
17. Courtade, J.A.; Klimek-Abercrombie, A.M.; Chen, Y.-C.; Patel, N.; Lu, P.Y.T.; Speake, C.; Orban, P.C.; Najafian, B.; Meneilly, G.; Greenbaum, C.J.; et al. Measurement of Pro-Islet Amyloid Polypeptide (1–48) in Diabetes and Islet Transplants. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2017**, *102*, 2595–2603. [CrossRef]
18. Ramzy, A.; Kieffer, T.J. Altered Islet Prohormone Processing: A Cause or Consequence of Diabetes? *Physiol. Rev.* **2022**, *102*, 155–208. [CrossRef]
19. Stadinski, B.D.; Delong, T.; Reisdorph, N.; Reisdorph, R.; Powell, R.L.; Armstrong, M.; Piganelli, J.D.; Barbour, G.; Bradley, B.; Crawford, E.; et al. Chromogranin A Is an Autoantigen in Type 1 Diabetes. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 225–231. [CrossRef]
20. Baker, R.L.; Bradley, B.; Wiles, T.A.; Lindsay, R.S.; Barbour, G.; Delong, T.; Friedman, R.S.; Haskins, K. NOD Mice Deficient in Chromogranin A Are Protected from Autoimmune Diabetes. *J. Immunol.* **2016**, *196*, 39–43. [CrossRef]
21. Srivastava, N.; Hu, H.; Vomund, A.N.; Peterson, O.J.; Baker, R.L.; Haskins, K.; Teyton, L.; Wan, X.; Unanue, E.R. Chromogranin A Deficiency Confers Protection From Autoimmune Diabetes via Multiple Mechanisms. *Diabetes* **2021**, *70*, 2860–2870. [CrossRef]
22. Gallo, M.P.; Femmini, S.; Antonioti, S.; Querio, G.; Alloati, G.; Levi, R. Catestatin Induces Glucose Uptake and GLUT4 Trafficking in Adult Rat Cardiomyocytes. *Biomed. Res. Int.* **2018**, *2018*, 2086109. [CrossRef] [PubMed]
23. Laslop, A.; Doblinger, A.; Weiss, U. Proteolytic Processing of Chromogranins. In *Chromogranins: Functional and Clinical Aspects*; Helle, K.B., Aunis, D., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer: Boston, MA, USA, 2002; pp. 155–166. [CrossRef]
24. Ochocińska, A.; Wysocka-Minczewicz, M.; Groszek, A.; Rybak, A.; Konopka, E.; Bierla, J.B.; Trojanowska, I.; Szalecki, M.; Cukrowska, B. Could I-FABP Be an Early Marker of Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes? Retrospective Study from the Tertiary Reference Centre. *Nutrients* **2022**, *14*, 414. [CrossRef] [PubMed]
25. Fiore, M.; Chaldakov, G.N.; Aloe, L. Nerve Growth Factor as a Signaling Molecule for Nerve Cells and Also for the Neuroendocrine-Immune Systems. *Rev. Neurosci.* **2009**, *20*, 133–145. [CrossRef] [PubMed]
26. Nathan, N.; Denizot, Y.; Huc, M.C.; Claverie, C.; Laubie, B.; Benveniste, J.; Arnoux, B. Elevated Levels of Paf-Acether in Blood of Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *Diabet. Metab.* **1992**, *18*, 59–62.
27. Spangenberg, P.; Schymik, C.; Hofmann, B.; Ostermann, G.; Rühling, K.; Till, U. Blood Platelet Behaviour in Patients with a Type 1 Diabetes Mellitus. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **1989**, *94*, 329–337. [CrossRef]
28. Schiel, R.; Block, M.; Stein, G.; Steveling, A.; Lücking, S.; Scherberich, J. Serum Uromodulin in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes Mellitus and Controls: Its Potential Role in Kidney Health. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **2022**. [CrossRef]
29. Araszkiwicz, A.; Bandurska-Stankiewicz, E.; Budzyński, A.; Cypryk, K.; Czech, A.; Czupryniak, I.; Drzewoski, J.; Dzida, G.; Dziedzic, T.; Franek, E.; et al. 2020 Guidelines on the Management of Diabetic Patients. A Position of Diabetes Poland. *Clin. Diabetol.* **2020**, *9*, 1–101.

30. Mahmud, F.H.; Elbarbary, N.S.; Fröhlich-Reiterer, E.; Holl, R.W.; Kordonouri, O.; Knip, M.; Simmons, K.; Craig, M.E. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Other Complications and Associated Conditions in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes. *Pediatr. Diabetes* **2018**, *19* (Suppl. 27), 275–286. [\[CrossRef\]](#)
31. Bennet, W.M.; Smith, D.M.; Bloom, S.R. Islet Amyloid Polypeptide: Does It Play a Pathophysiological Role in the Development of Diabetes? *Diabet. Med.* **1994**, *11*, 825–829. [\[CrossRef\]](#)
32. Scherbaum, W.A. The Role of Amylin in the Physiology of Glycemic Control. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **1998**, *106*, 97–102. [\[CrossRef\]](#)
33. Denroche, H.C.; Verchere, C.B. IAPP and Type 1 Diabetes: Implications for Immunity, Metabolism and Islet Transplants. *J. Mol. Endocrinol.* **2018**, *60*, R57–R75. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Khémémourian, L.; Killian, J.A.; Höppener, J.W.M.; Engel, M.F.M. Recent Insights in Islet Amyloid Polypeptide-Induced Membrane Disruption and Its Role in Beta-Cell Death in Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp. Diabetes Res.* **2008**, *2008*, 421287. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. O'Brien, T.D.; Butler, P.C.; Westermark, P.; Johnson, K.H. Islet Amyloid Polypeptide: A Review of Its Biology and Potential Roles in the Pathogenesis of Diabetes Mellitus. *Vet. Pathol.* **1993**, *30*, 317–332. [\[CrossRef\]](#)
36. Zraika, S.; Hull, R.L.; Verchere, C.B.; Clark, A.; Potter, K.J.; Fraser, P.E.; Raleigh, D.P.; Kahn, S.E. Toxic Oligomers and Islet Beta Cell Death: Guilty by Association or Convicted by Circumstantial Evidence? *Diabetologia* **2010**, *53*, 1046–1056. [\[CrossRef\]](#)
37. Westermark, P.; Andersson, A.; Westermark, G.T. Islet Amyloid Polypeptide, Islet Amyloid, and Diabetes Mellitus. *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 795–826. [\[CrossRef\]](#)
38. Watanabe, T. The Emerging Roles of Chromogranins and Derived Polypeptides in Atherosclerosis, Diabetes, and Coronary Heart Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6118. [\[CrossRef\]](#)
39. Bandyopadhyay, G.K.; Vu, C.U.; Gentile, S.; Lee, H.; Biswas, N.; Chi, N.-W.; O'Connor, D.T.; Mahata, S.K. Catestatin (Chromogranin A(352-372)) and Novel Effects on Mobilization of Fat from Adipose Tissue through Regulation of Adrenergic and Leptin Signaling. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 23141–23151. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Herold, Z.; Herold, M.; Nagy, P.; Patocs, A.; Doleschall, M.; Somogyi, A. Serum Chromogranin A Level Continuously Rises with the Progression of Type 1 Diabetes, and Indicates the Presence of Both Enterochromaffin-like Cell Hyperplasia and Autoimmune Gastritis. *J. Diabetes Investig.* **2020**, *11*, 865–873. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Herold, Z.; Doleschall, M.; Kovcsdi, A.; Patocs, A.; Somogyi, A. Chromogranin A and Its Role in the Pathogenesis of Diabetes Mellitus. *Endokrynol. Pol.* **2018**, *69*, 598–610. [\[CrossRef\]](#)
42. Herold, Z.; Nagy, P.; Patocs, A.; Somogyi, A. The role of chromogranin-A and its derived peptide, WE-14 in the development of type 1 diabetes mellitus. *Orv. Hetil.* **2015**, *156*, 163–170. [\[CrossRef\]](#)
43. Pittenger, G.; Vinik, A. Nerve Growth Factor and Diabetic Neuropathy. *Exp. Diabetes Res.* **2003**, *4*, 271–285. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Faradj, V.; Sotelo, J. Low Serum Levels of Nerve Growth Factor in Diabetic Neuropathy. *Acta Neurol. Scand.* **1990**, *81*, 402–406. [\[CrossRef\]](#)
45. Schmidt, R.E. The Role of Nerve Growth Factor in the Pathogenesis and Therapy of Diabetic Neuropathy. *Diabet. Med.* **1993**, *10* (Suppl. 2), 105–135. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Cavallo-Perin, P.; Lupia, E.; Gruden, G.; Olivetti, C.; De Martino, A.; Cassader, M.; Furlani, D.; Servillo, L.; Quagliuolo, L.; Iorio, E.; et al. Increased Blood Levels of Platelet-activating Factor in Insulin-dependent Diabetic Patients with Microalbuminuria. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2000**, *15*, 994–999. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Ersoy, B.; Hüseyinov, A.; Darcan, Ş. The Role of Platelet-Activating Factor in Pathogenesis of Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* **2005**, *28*, 980. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Bjornstad, P.; Singh, S.K.; Snell-Bergeon, J.K.; Lovshin, J.A.; Lytvyn, Y.; Lovblom, L.E.; Rewers, M.J.; Boulet, G.; Lai, V.; Tse, J.; et al. The Relationships between Markers of Tubular Injury and Intrarenal Hemodynamic Function in Adults with and without Type 1 Diabetes: Results from the Canadian Study of Longevity in Type 1 Diabetes. *Obes. Metab.* **2019**, *21*, 575–583. [\[CrossRef\]](#)
49. Bjornstad, P.; Wiromrat, P.; Johnson, R.J.; Sippl, R.; Cherney, D.Z.I.; Wong, R.; Rewers, M.J.; Snell-Bergeon, J.K. Serum Uromodulin Predicts Less Coronary Artery Calcification and Diabetic Kidney Disease Over 12 Years in Adults With Type 1 Diabetes: The CACTI Study. *Diabetes Care* **2019**, *42*, 297–302. [\[CrossRef\]](#)
50. Paulsson, J.E.; Ludvigsson, J.; Carlsson, A.; Casas, R.; Forsander, G.; Ivarsson, S.A.; Kockum, I.; Lernmark, Å.; Marcus, C.; Lindblad, B.; et al. High Plasma Levels of Islet Amyloid Polypeptide in Young with New-Onset of Type 1 Diabetes Mellitus. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e93053. [\[CrossRef\]](#)
51. Gottlieb, P.A.; DeLong, T.; Baker, R.L.; Fitzgerald-Miller, L.; Wagner, R.; Cook, G.; Rewers, M.R.; Michels, A.; Haskins, K. Chromogranin A Is a T Cell Antigen in Human Type 1 Diabetes. *J. Autoimmun.* **2014**, *50*, 38–41. [\[CrossRef\]](#)
52. Xu, G.; Grimes, T.D.; Grayson, T.B.; Chen, J.; Thielen, L.A.; Tse, H.M.; Li, P.; Kanke, M.; Lin, T.-T.; Schepmoes, A.A.; et al. Exploratory Study Reveals Far Reaching Systemic and Cellular Effects of Verapamil Treatment in Subjects with Type 1 Diabetes. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 1159. [\[CrossRef\]](#)
53. DeLong, T.; Baker, R.L.; He, J.; Haskins, K. Novel Autoantigens for Diabetogenic CD4 T Cells in Autoimmune Diabetes. *Immunity Res.* **2013**, *55*, 167–172. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Jin, N.; Wang, Y.; Crawford, F.; White, J.; Marrack, P.; Dai, S.; Kappler, J.W. N-Terminal Additions to the WE14 Peptide of Chromogranin A Create Strong Autoantigen Agonists in Type 1 Diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 13318. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

55. Herold, Z.; Doleschall, M.; Somogyi, A. Role and Function of Granin Proteins in Diabetes Mellitus. *World J. Diabetes* **2021**, *12*, 1081–1092. [CrossRef] [PubMed]
56. Muntjewerff, E.M.; Dunkel, G.; Nicolaisen, M.J.T.; Mahata, S.K.; van den Bogaart, G. Catestatin as a Target for Treatment of Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2199. [CrossRef] [PubMed]
57. Ying, W.; Mahata, S.; Bandyopadhyay, G.K.; Zhou, Z.; Wollam, J.; Vu, J.; Mayoral, R.; Chi, N.-W.; Webster, N.J.G.; Corti, A.; et al. Catestatin Inhibits Obesity-Induced Macrophage Infiltration and Inflammation in the Liver and Suppresses Hepatic Glucose Production, Leading to Improved Insulin Sensitivity. *Diabetes* **2018**, *67*, 841–848. [CrossRef] [PubMed]
58. O'Connor, D.T.; Kailasam, M.T.; Kennedy, B.P.; Ziegler, M.G.; Yanaihara, N.; Parmer, R.J. Early Decline in the Catecholamine Release-Inhibitory Peptide Catestatin in Humans at Genetic Risk of Hypertension. *J. Hypertens.* **2002**, *20*, 1335–1345. [CrossRef] [PubMed]
59. O'Connor, D.T.; Zhu, G.; Rao, E.; Taupenot, L.; Fung, M.M.; Das, M.; Mahata, S.K.; Mahata, M.; Wang, L.; Zhang, K.; et al. Heritability and Genome-Wide Linkage in US and Australian Twins Identify Novel Genomic Regions Controlling Chromogranin A. *Circulation* **2008**, *118*, 247–257. [CrossRef]
60. Zivkovic, P.M.; Matetic, A.; Tadin Hadjina, I.; Rusic, D.; Vilovic, M.; Supic-Domic, D.; Borovac, J.A.; Mudnic, I.; Tonkic, A.; Bozic, J. Serum Catestatin Levels and Arterial Stiffness Parameters Are Increased in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 628. [CrossRef]
61. Aloe, L.; Bracci-Laudiero, L.; Alleva, E.; Lambiase, A.; Micera, A.; Tirassa, P. Emotional Stress Induced by Parachute Jumping Enhances Blood Nerve Growth Factor Levels and the Distribution of Nerve Growth Factor Receptors in Lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10440–10444. [CrossRef]
62. Azar, S.T.; Major, S.C.; Safieh-Garabedian, B. Altered Plasma Levels of Nerve Growth Factor and Transforming Growth Factor-B2 in Type-1 Diabetes Mellitus. *Brain Behav. Immun.* **1999**, *13*, 361–366. [CrossRef]
63. Kim, H.C.; Cho, Y.J.; Ahn, C.W.; Park, K.S.; Kim, J.C.; Nam, J.S.; Im, Y.S.; Lee, J.E.; Lee, S.C.; Lee, H.K. Nerve Growth Factor and Expression of Its Receptors in Patients with Diabetic Neuropathy. *Diabet. Med.* **2009**, *26*, 1228–1234. [CrossRef] [PubMed]
64. Bonini, S.; Lambiase, A.; Bonini, S.; Angelucci, F.; Magrini, L.; Manni, L.; Aloe, L. Circulating Nerve Growth Factor Levels Are Increased in Humans with Allergic Diseases and Asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 10955–10960. [CrossRef] [PubMed]
65. Liu, H.-T.; Kuo, H.-C. Increased Urine and Serum Nerve Growth Factor Levels in Interstitial Cystitis Suggest Chronic Inflammation Is Involved in the Pathogenesis of Disease. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44687. [CrossRef] [PubMed]
66. De Santis, S.; Pace, A.; Bove, L.; Cognetti, F.; Properzi, E.; Fiore, M.; Triaca, V.; Savarese, A.; Simone, M.D.; Jandolo, B.; et al. Patients Treated with Antitumor Drugs Displaying Neurological Deficits Are Characterized by a Low Circulating Level of Nerve Growth Factor. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 90–95. [PubMed]
67. Lang, U.E.; Gallinat, J.; Kuhn, S.; Jockers-Scherübl, M.C.; Hellweg, R. Nerve Growth Factor and Smoking Cessation. *AJP* **2002**, *159*, 674-a. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

materiały uzupełniające do pracy: **Ochocińska, A.**; Wysocka - Mincewicz, M.; Świdorska, J.; Cukrowska, B. *Selected Serum Markers Associated with Pathogenesis and Clinical Course of Type 1 Diabetes in Pediatric Patients – The Effect of Disease Duration*. J. Clin. Med. 2023, 12, 2151.

Table S1. Selected markers in T1D patients with different disease duration and healthy controls – concentrations and significance of differences.

	newly diagnosed	3 - 5 yrs	6 - 7 yrs	> 7 yrs	control group
IAPP [pg/ml]					
newly diagnosed	60.1 (17.3 – 148)				
3 - 5 yrs	$p = 0.419$	53.8 (36.1 – 333)			
6 - 7 yrs	$p = 0.499$	$p = 0.870$	53.0 (25.1 – 221)		
> 7 yrs	$p = 0.226$	$p = 0.043$	$p = 0.077$	80.9 (21.6 – 499)	
control group	$p < 0.000001$	$p < 0.000001$	$p < 0.000001$	$p < 0.000001$	33.5 (16.9 – 49.1)
proAPP [pg/ml]					
newly diagnosed	99.6 (34.8 – 258)				
3 - 5 yrs	$p = 0.204$	90.5 (42.1 – 958)			
6 - 7 yrs	$p = 0.306$	$p = 0.735$	88.3 (55.7 – 452)		
> 7 yrs	$p = 0.308$	$p = 0.092$	$p = 0.077$	102 (58.9 – 352)	
control group	$p < 0.000001$	$p < 0.000001$	$p < 0.000001$	$p < 0.000001$	57.6 (19.5 – 82.3)
CST [ng/ml]					
newly diagnosed	35.2 (0.001 – 70.1)				
3 - 5 yrs	$p = 0.0008$	19.7 (0.007 – 95.6)			
6 - 7 yrs	$p = 0.384$	$p = 0.697$	20.0 (0.005 – 305)		
> 7 yrs	$p = 0.172$	$p = 0.0008$	$p = 0.019$	27.0 (1.45 – 92.3)	
control group	$p = 0.003$	$p = 0.707$	$p = 0.565$	$p = 0.001$	20.2 (0.003 – 21.5)
ChgA [ng/ml]					
newly diagnosed	74.5 (40.5 – 98.5)				
3 - 5 yrs	$p = 0.0001$	52.5 (20.5 – 104)			
6 - 7 yrs	$p = 0.0005$	$p = 0.572708$	54.5 (22.5 – 94.5)		
> 7 yrs	$p = 0.000009$	$p = 0.536305$	$p = 0.390$	50.3 (15.5 – 98.0)	
control group	$p = 0.005$	$p = 0.002$	$p = 0.054$	$p = 0.001$	34.5 (11.5 – 88.0)
NGF [pg/ml]					
newly diagnosed	12.7 (3.45 – 17.9)				
3 - 5 yrs	$p = 0.079$	4.49 (1.09 – 804)			
6 - 7 yrs	$p = 0.002$	$p = 0.508$	4.49 (0.52 – 37.5)		
> 7 yrs	$p = 0.492$	$p = 0.164$	$p = 0.153$	6.21 (0.52 – 45.8)	

control group	$p = 0.000004$	$p = 0.553$	$p = 0.735$	$p = 0.089$	4.30 (3.03 – 37.9)
PAF [ng/ml]					
newly diagnosed	0.20 (0.11 – 0.43)				
3 - 5 yrs	$p = 0.000633$	0.24 (0.12 – 5.18)			
6 - 7 yrs	$p = 0.000995$	$p = 0.284$	0.25 (0.18 – 2.67)		
> 7 yrs	$p = 0.002042$	$p = 0.119$	$p = 0.435$	0.29 (0.12 – 3.9)	
control group	$p = 0.588$	$p = 0.000003$	$p = 0.000005$	$p = 0.000113$	0.19 (0.11 – 1.83)
UMOD [ng/ml]					
newly diagnosed	305 (90.5 – 610)				
3 - 5 yrs	$p = 0.969$	297 (39.0 – 875)			
6 - 7 yrs	$p = 0.565$	$p = 0.560$	275 (80.5 – 465)		
> 7 yrs	$p = 0.347$	$p = 0.340$	$p = 0.603$	254 (104 – 673)	
control group	$p = 0.796$	$p = 0.895$	$p = 0.600$	$p = 0.309$	278 (51.0 – 555)
I-FABP [pg/ml]					
newly diagnosed	1015 (280 – 2990)				
3 - 5 yrs	$p = 0.898$	960 (260 – 4560)			
6 - 7 yrs	$p = 0.220$	$p = 0.118$	790 (130 – 2900)		
> 7 yrs	$p = 0.365$	$p = 0.317$	$p = 0.061$	1140 (440 – 3450)	
control group	$p = 0.0001$	$p < 0.000001$	$p = 0.003$	$p = 0.000003$	485 (170 – 2730)

Omówienie wyników

W pracy poglądowej *Autoantibodies against islet cell antigens - current diagnostic possibilities/ Autoprzeciwciała przeciwko antygenom komórek wysp trzustkowych – aktualne możliwości diagnostyczne* (Ochocińska i wsp., Diag Lab, 2022) podsumowano aktualny stan wiedzy na temat diagnostyki T1D w oparciu o pomiar autoprzeciwciał przeciwko antygenom komórek wysp trzustkowych (ICA, anty-GAD, anty-IA-2A, ZnT8A), jak również autoprzeciwciał przeciwko insulinie (IAA). Podkreślono wskazania do wykonania oznaczeń zgodnie z aktualnymi wytycznymi praktyki klinicznej.

Zwrócono również uwagę, na aktualnie dostępne w sprzedaży testy do oceny autoprzeciwciał przeciwko antygenom komórek wysp trzustkowych, które wydają się niewystarczające do potwierdzenia wszystkich przypadków T1D ze względu na brak występowania autoprzeciwciał u części pacjentów w chwili rozpoznania. Ponadto, odniesiono się do doniesień na temat istnienia innych, jeszcze nieodkrytych przeciwciał.

W pracy oryginalnej *Could I-FABP Be an Early Marker of Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes? Retrospective Study from the Tertiary Reference Centre* (Ochocińska i wsp., Nutrients, 2022) w pierwszym etapie analiz oceniano stężenia I-FABP w surowicach pacjentów z T1D, pacjentów z T1D i aktywną CD oraz pacjentów z aktywną CD bez T1D. Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w stężeniach I-FABP pomiędzy zdrowymi i chorymi uczestnikami badania. Analiza statystyczna nie wykazała jednak istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami pacjentów z: T1D, T1D-CD, CD bez T1D. Znaczenie białka I-FABP w wykrywaniu CD u pacjentów z T1D oceniono analizą krzywej ROC otrzymując pole pod krzywą (AUC) na poziomie 0,557. Dla stężenia I-FABP w surowicy wynoszącego >965 pg/ml (oszacowanego jako związane ze współistnieniem obu chorób) wykazano czułość i swoistość na poziomie 51,7 i 59,7%.

W drugim etapie oceniono wpływ stosowania diety bezglutenowej (GFD) na stężenie białka I-FABP u pacjentów z T1D i aktywną CD oraz u pacjentów z aktywną CD bez T1D. Wykazano, że stężenie I-FABP w surowicy było istotnie statystycznie niższe u pacjentów przebywających na GFD, bez względu na jednostkę chorobową, w porównaniu z pacjentami niestosującymi GFD i osiągało wartości zbliżone dla grupy kontrolnej dzieci zdrowych. Szczegółowa analiza czasu stosowania w/w diety wykazała, że stosowanie GFD przez co najmniej 6 miesięcy u pacjentów z T1D-CD wywołuje obniżenie stężenia I-FABP o ponad 50%.

W etapie trzecim analizowano stężenia I-FABP przed rozpoznaniem CD u pacjentów z rozpoznaną T1D. Średnia wartość I-FABP w podgrupie pacjentów z ujemnym wynikiem serologicznym CD na rok przed rozpoznaniem CD (T1D-CD-1) nie różniła się istotnie statystycznie od pacjentów z T1D. Różniła się jednak istotnie od grupy kontrolnej i pacjentów z T1D-CD po leczeniu GFD. Opisane wyniki badań pokazały, że I-FABP nie może być wczesnym markerem CD u chorych z T1D, gdyż uszkodzenie bariery nabłonkowej jelita u pacjentów z T1D występuje niezależnie od rozwoju CD.

Ocena stężeń I-FABP w kontekście stosowanej GFD pozwala sugerować, że gluten może być szkodliwy i indukować procesy autoimmunizacyjne nie tylko u pacjentów z CD, ale także u chorych z innymi chorobami autoimmunizacyjnymi, w tym T1D. Otwartym pozostaje pytanie czy GFD może być skuteczna u pacjentów z T1D bez CD.

Szczegółową dyskusję wyników przedstawiono na str. 36.

W pracy oryginalnej *Selected Serum Markers Associated with Pathogenesis and Clinical Course of Type 1 Diabetes in Pediatric Patients – The Effect of Disease Duration* (Ochocińska i wsp., J. Clin. Med., 2023) w pierwszym etapie dokonano wnikliwej charakterystyki grupy badanej. Wyodrębnione na podstawie czasu trwania choroby podgrupy różniły się istotnie statystycznie pod względem parametrów biochemicznych odzwierciedlających metabolizm węglowodanów (glukoza, HbA1C, insulina), metabolizm lipidów (cholesterol HDL i trójglicerydy), jak również parametru odzwierciedlającego czynność nerek (kreatynina). W przypadku glukozy i HbA1C najwyższe stężenia obserwowano u nowo zdiagnozowanych pacjentów. Wraz z czasem trwania choroby ich stężenie obniżało się, jednak po 7 latach od rozpoznania T1D, zaobserwowano wyraźny wzrost stężeń obu substancji. Mimo, że zaobserwowano statystycznie istotne różnice między stężeniami insuliny w poszczególnych podgrupach, wszystkie wartości mieściły się w granicach wartości referencyjnych. Profile lipidowe, niezależnie od czasu trwania T1D, mieściły się w zalecanych w aktualnych wytycznych wartościach docelowych. W przypadku cholesterolu HDL i triglicerydów, wartości zmieniały się pomiędzy podgrupami T1D osiągając statystycznie istotne różnice, ale bez znaczenia klinicznego. Podobnie w przypadku kreatyniny zmiany istotne statystycznie pomiędzy podgrupami nie były istotne klinicznie.

W dalszym etapie analizy oceniano stężenia wybranych substancji czynnych u pacjentów z T1D i w grupie HC. Z wyjątkiem stężenia UMOD i NGF, stężenia badanych substancji były istotnie statystycznie wyższe w grupie T1D w porównaniu z HC. W przypadku

NFG różnice między grupą T1D a HC nie były znaczące, ale wartość p była na poziomie trendu statystycznego ($p = 0,056$). Tendencję tę potwierdziła m.in. późniejsza analiza w bardziej szczegółowych podgrupach (nowe przypadki vs. pacjenci z chorobą przewlekłą). Porównując stężenia badanych substancji u dzieci ze świeżo rozpoznaną T1D w porównaniu z grupą dzieci z T1D leczonych przez co najmniej 3 lata wykazano, że czas trwania T1D wpływał na poziomy NGF, ChgA i PAF. Poziomy PAF były znacznie niższe w nowo zdiagnozowanej T1D w porównaniu z pacjentami z T1D trwającą > 3 lata.

W ostatnim etapie przeanalizowano szczegółowo wpływ czasu trwania choroby na stężenia wybranych substancji czynnych u dzieci z T1D. Ponieważ zaobserwowano różnice w podgrupach T1D z krótszym i dłuższym czasem trwania choroby, całą grupę T1D podzielono na trzy mniejsze (3–5 lat, 6–7 lat i >7 lat), a następnie ponownie przeanalizowano. Nie zaobserwowano wpływu czasu trwania choroby na poziomy IAPP, proIAPP i I-FABP, ale stężenia każdej substancji różniły się istotnie statystycznie pomiędzy pacjentami z T1D (w każdej podgrupie) i HC, z wyjątkiem UMOD.

Natomiast na stężenia CST, ChgA, PAF i NGF istotnie statystycznie wpływał czas, jaki upłynął od rozpoznania, ale kierunek zmian zależał od rodzaju biomarkera. W przypadku ChgA najwyższe stężenia obserwowano u pacjentów tuż po rozpoznaniu T1D i różniły się one istotnie statystycznie zarówno od HC i grupy pacjentów leczonych przez 3–5 lat, 6–7 lat i >7 lat. Stężenie ChgA zmniejszało się w czasie (w każdym przedziale czasowym było istotnie statystycznie niższe w porównaniu z nowo zdiagnozowanymi pacjentami). Chociaż stężenie CST w surowicy nie różniło się między pacjentami z nowo rozpoznaną T1D oraz leczonymi >3 lat szczegółowa analiza w podgrupach pacjentów wykazała możliwy wpływ czasu trwania choroby na stężenie biomarkera. Najwyższe stężenia CST obserwowano u pacjentów z nowo rozpoznaną T1D. Poziomy CST były niższe u pacjentów leczonych przez 3–7 lat, ale po 7 latach od rozpoznania zaobserwowano ponownie wysokie wartości biomarkera. Zaobserwowano statystycznie istotne różnice pomiędzy pacjentami nowo zdiagnozowanymi i leczonymi przez 3–5 lat, pacjentami leczonymi przez 3–5 lat i leczonymi >7 lat, a także pacjentami leczonymi przez 6–7 lat i >7 lat. W przypadku PAF u pacjentów z dłuższym czasem trwania choroby zaobserwowano wyższe stężenia biomarkera. Istotną statystycznie różnicę zaobserwowano w podgrupach leczonych przez 3–5 lat, 6–7 lat i >7 lat w stosunku do osób z nowo rozpoznaną T1D. Najwyższe stężenie NGF zaobserwowano u pacjentów z nowo rozpoznaną T1D. Następnie odnotowano spadek wartości u pacjentów leczonych przez 3–5 lat, 6–7 lat i >7 lat. Istotną statystycznie różnicę zaobserwowano jedynie u pacjentów nowo zdiagnozowanych – w stosunku do HC oraz chorych leczonych przez 6–7 lat.

Spośród wybranych wskaźników tylko UMOD nie wykazała istotnych statystycznie różnic między dziećmi z T1D a HC, ale poziomy UMOD u pacjentów z T1D były skorelowane dodatnio ze stężeniem kreatyniny w surowicy. Może to zatem sugerować, że UMOD powinna być raczej oceniana w moczu aniżeli w surowy.

Pomiar stężeń wybranych markerów w różnych stadiach rozwoju choroby pozwolił spojrzeć na problem szerzej i potwierdził wcześniejsze przypuszczenia dotyczące roli wybranych markerów w T1D. Badania jednoznacznie potwierdzają, że substancje, na których stężenie nie miał wpływu czas trwania choroby są zaangażowane w patomechanizm T1D (proIAPP, IAPP, I-FABP), natomiast biomarkery takie jak CST, ChgA, PST i NGF - których stężenia były zróżnicowane w zależności od czasu rozpoznania T1D, są związane z przebiegiem T1D i mogą odzwierciedlać biochemiczny początek późnych powikłań, co wymaga dalszych badań określających ich wartość diagnostyczną.

Szczegółową dyskusję wyników przedstawiono na str. 47.

Wnioski

Na podstawie analizy wyników badań potwierdzono udział wytypowanych substancji czynnych w przebiegu T1D i wyciągnięto następujące wnioski:

1. Ocena stężenia I-FABP w surowicy pacjentów z T1D może być wykorzystywana jako niezależny marker przepuszczalności jelitowej, jednak marker ten nie może być wykorzystywany do przewidywania zachorowania na CD, gdyż problem nieszczelności bariery nabłonkowej jelita występuje u chorych z T1D niezależnie od rozwoju CD.
2. Stężenia w surowicy krwi niektórych z badanych substancji (CST, ChgA, PAF i NGF) zależą od czasu trwania T1D, co może wskazywać na ich przydatność w procesie prognozowania ewentualnych powikłań w trakcie przebiegu T1D, jednak niezbędny jest dłuższy czas obserwacji pacjentów ze względu na brak powikłań w grupie badanych dzieci z T1D.
3. Dla potwierdzenia użyteczności praktycznej wskazanych biomarkerów należy kontynuować badania w zakresie ustalenia ich wartości referencyjnych w populacji dzieci zdrowych oraz analiz korelacji badanych substancji w odniesieniu do kontroli glikemii i innych parametrów biochemicznych.

Piśmiennictwo

1. Del Chierico F, Rapini N, Deodati A, Matteoli MC, i wsp.: Pathophysiology of Type 1 Diabetes and Gut Microbiota Role. *Int J Mol Sci.* 2022; 23: 14650.
2. IDF, 2022. IDF Diabetes Atlas, Tenth Edition. URL: <https://diabetesatlas.org/>.
3. Cusick M, Meleth AD, Agrón E, Fisher MR, i wsp.: Associations of mortality and diabetes complications in patients with type 1 and type 2 diabetes: early treatment diabetic retinopathy study report no. 27. *Diabetes Care.* 2005; 28: 617–625.
4. Karges B, Durinovic-Belló I, Heinze E, Debatin KM, i wsp.: Immunological mechanisms associated with long-term remission of human type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2006; 22: 184–189.
5. Khosravi-Maharlooei M, Madley R, Borsotti C, Ferreira LMR, i wsp.: Modeling human T1D-associated autoimmune processes. *Mol Metab.* 2021; 56: 101417.
6. Gomez-Muñoz L, Perna-Barrull D, Caroz-Armayones JM, Murillo M, i wsp.: Candidate Biomarkers for the Prediction and Monitoring of Partial Remission in Pediatric Type 1 Diabetes. *Front Immunol.* 2022; 13: 825426.
7. Yapanis M, James S, Craig ME, O’Neal D, i wsp.: Complications of Diabetes and Metrics of Glycemic Management Derived From Continuous Glucose Monitoring. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022; 107(6): e2221–2236.
8. Chen Z, Natarajan R.: Epigenetic modifications in metabolic memory: What are the memories, and can we erase them? *Am J Physiol-Cell Physiol.* 2022; 323: C570–582.
9. Piona C, Ventrice C, Marcovecchio L, Chiarelli F, i wsp.: Long-term complications of type 1 diabetes: what do we know and what do we need to understand? *Minerva Pediatr.* 2021; 73: 504–522.
10. Chawla A, Chawla R, Jaggi S.: Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian J Endocrinol Metab.* 2016; 20: 546–551.
11. Yi L, Swensen AC, Qian WJ.: Serum biomarkers for diagnosis and prediction of type 1 diabetes. *Transl Res J Lab Clin Med.* 2018; 201: 13–25.

12. Bonifacio E.: Predicting Type 1 Diabetes Using Biomarkers. *Diabetes Care*. 2015; 38: 989–996.
13. Saisho Y, Butler AE, Manesso E, Elashoff D, i wsp.: β -Cell Mass and Turnover in Humans. *Diabetes Care*. 2013; 36(1): 111–117.
14. Fava S.: Glycaemic control: a balancing act or a different approach? *Curr Diabetes Rev*. 2014; 10(2): 124–130.
15. Dovic K, Battelino T.: Time in range centered diabetes care. *Clin Pediatr Endocrinol*. 2021; 30: 1–10.
16. Grauslund J, Jørgensen TMM, Nybo M, Green A, Rasmussen LM, i wsp.: Risk factors for mortality and ischemic heart disease in patients with long-term type 1 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2010; 24: 223–228.
17. Hussain N.: Implications of using HBA1C as a diagnostic marker for diabetes. *Diabetol Int*. 2016; 7: 18-24.
18. Lyons TJ, Basu A.: Biomarkers in diabetes: hemoglobin A1c, vascular and tissue markers. *Transl Res*. 2012; 159: 303–312.
19. Cichocka E, Gumprecht J.: Is HbA1c the only choice? Alternative biomarkers for glycaemic control assessment. *Clin Diabetol*. 2017; 6: 136–141.
20. Sherwani SI, Khan HA, Ekhzaimy A, Masood A, i wsp.: Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients. *Biomark Insights*. 2016; 11: 95–104.
21. Sheehy D, Quinnell S, Vegas AJ.: Targeting Type 1 Diabetes: Selective Approaches for New Therapies. *Biochemistry*. 2019; 58: 214–233.
22. Ochocińska A, Wysocka-Mincewicz M, Cukrowska B.: Autoantibodies against islet cellantigens: Current diagnostic possibilities. *Diagn Lab*. 2022; 58: 114–119.
23. Bonifacio E, Achenbach P.: Birth and coming of age of islet autoantibodies. *Clin Exp Immunol*. 2019; 198: 294–305.
24. Araszkiwicz A, Bandurska-Stankiewicz E, Borys S, Budzyński A, i wsp.: 2023 Guidelines on the management of patients with diabetes A position of Diabetes Poland. 2023; 3: 1-133.

25. Patel SK, Ma CS, Furlanos S, Greenfield JR.: Autoantibody-Negative Type 1 Diabetes: A Neglected Subtype. *Trends Endocrinol Metab TEM*. 2021; 32: 295–305.
26. Tiberti C, Buzzetti R, Anastasi E, Dotta F, i wsp.: Autoantibody negative new onset type 1 diabetic patients lacking high risk HLA alleles in a caucasian population: are these type 1b diabetes cases? *Diabetes Metab Res Rev*. 2000; 16: 8–14.
27. Rorbach-Dolata A, Kubis A, Piwowar A.: Epigenetic modifications: An important mechanism in diabetic disturbances. *Postępy Hig Med Dośw*. 2017; 71: 960–974.
28. Cugalj Kern B, Trebušak Podkrajšek K, Kovač J, Šket R, i wsp.: The Role of Epigenetic Modifications in Late Complications in Type 1 Diabetes. *Genes*. 2022; 13: 705.
29. den Hollander NHM, Roep BO.: From Disease and Patient Heterogeneity to Precision Medicine in Type 1 Diabetes. *Front Med*. 2022; 9: 932086.
30. Bennet WM, Smith DM, Bloom SR.: Islet amyloid polypeptide: does it play a pathophysiological role in the development of diabetes? *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. 1994; 11: 825–829.
31. Scherbaum WA.: The role of amylin in the physiology of glycemic control. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc*. 1998; 106: 97–102.
32. Denroche HC, Verchere CB.: IAPP and type 1 diabetes: implications for immunity, metabolism and islet transplants. *J Mol Endocrinol*. 2018; 60: R57–75.
33. Khemtémourian L, Killian JA, Höppener JWM, Engel MFM.: Recent insights in islet amyloid polypeptide-induced membrane disruption and its role in beta-cell death in type 2 diabetes mellitus. *Exp Diabetes Res*. 2008; 2008: 421287.
34. O'Brien TD, Butler PC, Westermark P, Johnson KH.: Islet amyloid polypeptide: a review of its biology and potential roles in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Vet Pathol*. 1993; 30: 317–332.
35. Otto-Buczowska E, Jarosz-Chobot P, Machnica Ł.: The role of amylin in glucose homeostasis regulation and possible future usage in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetol Doswiadczalna Klin*. 2009; 9: 41–45.

36. Ramzy A, Kieffer TJ.: Altered islet prohormone processing: a cause or consequence of diabetes? *Physiol Rev.* 2022; 102: 155–208.
37. Courtade JA, Klimek-Abercrombie AM, Chen YC, Patel N, i wsp.: Measurement of Pro-Islet Amyloid Polypeptide (1-48) in Diabetes and Islet Transplants. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017; 102: 2595–2603.
38. Westermark P, Andersson A, Westermark GT.: Islet Amyloid Polypeptide, Islet Amyloid, and Diabetes Mellitus. *Physiol Rev.* 2011; 91: 795–826.
39. Watanabe T.: The Emerging Roles of Chromogranins and Derived Polypeptides in Atherosclerosis, Diabetes, and Coronary Heart Disease. *Int J Mol Sci.* 2021; 22: 6118.
40. Bandyopadhyay GK, Vu CU, Gentile S, Lee H, i wsp.: Catestatin (chromogranin A (352-372)) and novel effects on mobilization of fat from adipose tissue through regulation of adrenergic and leptin signaling. *J Biol Chem.* 2012; 287: 23141–23151.
41. Herold Z, Herold M, Nagy P, Patocs A, i wsp.: Serum chromogranin A level continuously rises with the progression of type 1 diabetes, and indicates the presence of both enterochromaffin-like cell hyperplasia and autoimmune gastritis. *J Diabetes Investig.* 2020; 11: 865–873.
42. Herold Z, Doleschall M, Kovcsdi A, Patocs A, i wsp.: Chromogranin A and its role in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Endokrynol Pol.* 2018; 69: 598–610.
43. Herold Z, Nagy P, Patócs A, Somogyi A.: The role of chromogranin-A and its derived peptide, WE-14 in the development of type 1 diabetes mellitus. *Orv Hetil.* 2015; 156: 163–170.
44. Pittenger G, Vinik A.: Nerve growth factor and diabetic neuropathy. *Exp Diabetes Res.* 2003; 4: 271–285.
45. Faradji V, Sotelo J.: Low serum levels of nerve growth factor in diabetic neuropathy. *Acta Neurol Scand.* 1990; 81: 402–406.
46. Schmidt RE.: The Role of Nerve Growth Factor in the Pathogenesis and Therapy of Diabetic Neuropathy. *Diabet Med.* 1993; 10: 10S-13S.

47. Cavallo-Perin P, Lupia E, Gruden G, Olivetti C, i wsp.: Increased blood levels of platelet-activating factor in insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15: 994–999.
48. Nathan N, Denizot Y, Huc MC, Claverie C, i wsp.: Elevated levels of paf-acether in blood of patients with type 1 diabetes mellitus. *Diabete Metab*. luty 1992; 18: 59–62.
49. Ersoy B, Hüseyinov A, Darcan Ş.: The Role of Platelet-Activating Factor in Pathogenesis of Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2005; 28: 980.
50. Bjornstad P, Wiromrat P, Johnson RJ, Sippl R, i wsp.: Serum Uromodulin Predicts Less Coronary Artery Calcification and Diabetic Kidney Disease Over 12 Years in Adults With Type 1 Diabetes: The CACTI Study. *Diabetes Care*. 2019; 42: 297–302.
51. Schiel R, Block M, Stein G, Steveling A, i wsp.: Serum uromodulin in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus and controls: Its potential role in kidney health. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc*. 2023; 131: 142-152.
52. Bjornstad P, Singh SK, Snell-Bergeon JK, Lovshin JA, i wsp.: The Relationships between Markers of Tubular Injury and Intrarenal Hemodynamic Function in Adults with and without Type 1 Diabetes: Results from the Canadian Study of Longevity in Type 1 Diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2019; 21: 575–583.
53. Bronský J, Chada M, Kotaska K, Průša R.: Amylin - its physiological role in humans. *Cesk Fysiol*. 2002; 51: 176–180.
54. Fu W, Patel A, Jhamandas JH.: Amylin Receptor: A Common Pathophysiological Target in Alzheimer's Disease and Diabetes Mellitus. *Front Aging Neurosci*. 2013; 5: 42.
55. Domanov YA, Kinnunen PKJ.: Islet amyloid polypeptide forms rigid lipid-protein amyloid fibrils on supported phospholipid bilayers. *J Mol Biol*. 2008; 376: 42–54.
56. Otto-Buczowska E, Mazur-Dworzecka U, Dworzecki T.: Role of amylin in glucose homeostasis and its perspective use in diabetes management. *Przegl Lek*. 2008; 65: 135–139.

57. Amiel SA, Heller SR, Macdonald IA, Schwartz SL, i wsp.: The effect of pramlintide on hormonal, metabolic or symptomatic responses to insulin-induced hypoglycaemia in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2005; 7: 504–516.
58. Hoogwerf BJ, Doshi KB, Diab D.: Pramlintide, the synthetic analogue of amylin: physiology, pathophysiology, and effects on glycemic control, body weight, and selected biomarkers of vascular risk. *Vasc Health Risk Manag.* 2008; 4: 355–362.
59. Hassan K, Heptulla RA.: Reducing postprandial hyperglycemia with adjuvant premeal pramlintide and postmeal insulin in children with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes.* 2009; 10: 264–268.
60. Jones MC.: Therapies for diabetes: pramlintide and exenatide. *Am Fam Physician.* 2007; 75: 1831–1835.
61. Kovatchev BP, Crean J, McCall A.: Pramlintide reduces the risks associated with glucose variability in type 1 diabetes. *Diabetes Technol Ther.* 2008; 10: 391–396.
62. Ryan GJ, Jobe LJ, Martin R.: Pramlintide in the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther.* 2005; 27: 1500–1512.
63. Singh-Franco D, Robles G, Gazze D.: Pramlintide acetate injection for the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther.* 2007; 29: 535–562.
64. Marrero DG, Crean J, Zhang B, Kellmeyer T, i wsp.: Effect of adjunctive pramlintide treatment on treatment satisfaction in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2007; 30: 210–216.
65. Rodriguez LM, Mason KJ, Haymond MW, Heptulla RA.: The role of prandial pramlintide in the treatment of adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr Res.* 2007; 62: 746–749.
66. Sims EK, Chaudhry Z, Watkins R, Syed F, i wsp.: Elevations in the Fasting Serum Proinsulin-to-C-Peptide Ratio Precede the Onset of Type 1 Diabetes. *Diabetes Care.* 2016; 39: 1519–1526.
67. Exley C, House E, Patel T, Wu L, i wsp.: Human pro-islet amyloid polypeptide (ProIAPP (1-48)) forms amyloid fibrils and amyloid spherulites in vitro. *J Inorg Biochem.* 2010; 104: 1125–1129.

68. Paulsson JF, Andersson A, Westermark P, Westermark GT.: Intracellular amyloid-like deposits contain unprocessed pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) in beta cells of transgenic mice overexpressing the gene for human IAPP and transplanted human islets. *Diabetologia*. 2006; 49: 1237–1246.
69. Mahata SK, Mahata M, Fung MM, O'Connor DT.: Catestatin: a multifunctional peptide from chromogranin A. *Regul Pept*. 2010; 162: 33–43.
70. Mahata SK, Kiranmayi M, Mahapatra NR.: Catestatin: A Master Regulator of Cardiovascular Functions. *Curr Med Chem*. 2018; 25: 1352–1374.
71. Pasqua T, Angelone T, Spena A, Cerra MC.: Biological Roles of the Eclectic Chromogranin-A-derived Peptide Catestatin. *Curr Med Chem*. 2017; 24: 3356–3372.
72. Gallo MP, Femminò S, Antoniotti S, Querio G, i wsp.: Catestatin Induces Glucose Uptake and GLUT4 Trafficking in Adult Rat Cardiomyocytes. *BioMed Res Int*. 2018; 2018: 2086109.
73. Deftos LJ.: Chromogranin A: its role in endocrine function and as an endocrine and neuroendocrine tumor marker. *Endocr Rev*. 1991; 12: 181–187.
74. Louthan O.: Chromogranin a in physiology and oncology. *Folia Biol (Praha)*. 2011; 57: 173–181.
75. Laslop A, Doblinger A, Weiss U.: Proteolytic processing of chromogranins. *Adv Exp Med Biol*. 2000; 482: 155-166.
76. Herold Z, Doleschall M, Somogyi A.: Role and function of granin proteins in diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2021; 12(7): 1081–1092.
77. Baker RL, Bradley B, Wiles TA, Lindsay RS, i wsp.: NOD mice deficient in chromogranin A are protected from autoimmune diabetes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2016; 196: 39–43.
78. Srivastava N, Hu H, Vomund AN, Peterson OJ, i wsp.: Chromogranin A Deficiency Confers Protection From Autoimmune Diabetes via Multiple Mechanisms. *Diabetes*. 2021; 70: 2860–2870.

79. Fiore M, Chaldakov GN, Aloe L.: Nerve growth factor as a signaling molecule for nerve cells and also for the neuroendocrine-immune systems. *Rev Neurosci*. 2009; 20: 133–145.
80. Apfel SC.: Nerve regeneration in diabetic neuropathy. *Diabetes Obes Metab*. 1999; 1: 3–11.
81. Derewenda ZS, Derewenda U.: The structure and function of platelet-activating factor acetylhydrolases. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 1998; 54: 446–455.
82. Ashraf MA, Nookala V.: *Biochemistry of Platelet Activating Factor*. 2023 Apr 10. W: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. PMID: 32491324.
83. Upton JEM, Grunebaum E, Sussman G, Vadas P.: Platelet Activating Factor (PAF): A Mediator of Inflammation. *Biofactors*. 2022; 48: 1189-1202.
84. Spangenberg P, Schymik C, Hofmann B, Ostermann G, i wsp.: Blood Platelet Behaviour in Patients with a Type I Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1989; 94: 329–337.
85. Schaeffer C, Devuyst O, Rampoldi L.: Uromodulin: Roles in Health and Disease. *Annu Rev Physiol*. 2021; 83: 477–501.
86. Hotamisligil GS, Bernlohr DA.: Metabolic functions of FABPs--mechanisms and therapeutic implications. *Nat Rev Endocrinol*. 2015; 11: 592–605.
87. Lau E, Marques C, Pestana D, Santoalha M, i wsp.: The role of I-FABP as a biomarker of intestinal barrier dysfunction driven by gut microbiota changes in obesity. *Nutr Metab*. 2016; 13: 31.
88. Pelsers MMAL, Namiot Z, Kisielewski W, Namiot A, i wsp.: Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin Biochem*. 2003; 36: 529–535.
89. Pham-Short A, Donaghue KC, Ambler G, Phelan H, i wsp.: Screening for Celiac Disease in Type 1 Diabetes: A Systematic Review. *Pediatrics*. 2015; 136: e170-176.
90. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, i wsp.: European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012; 54: 136–160.

91. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó I, Kurppa K, i wsp.: European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2020; 70: 141–156.
92. Fröhlich-Reiterer E, Elbarbary NS, Simmons K, Buckingham B, i wsp.: ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2022: Other complications and associated conditions in children and adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes.* 2022; 23: 1451–1467.

Spis tabel i rycin

Ochocińska, A.; Wysocka-Mincewicz, M.; Groszek, A.; Rybak, A.; Konopka, E.; Bierła, J.B.; Trojanowska, I.; Szalecki, M.; Cukrowska, B. *Could I-FABP Be an Early Marker of Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes? Retrospective Study from the Tertiary Reference Centre.* *Nutrients* 2022, 14, 414.

- strona 33 Tabela 1. Charakterystyka grupy badanej: pacjenci z cukrzycą typu 1 (T1D), pacjenci z cukrzycą typu 1 i celiakią (T1D-CD), pacjenci z celiakią (CD). Wyodrębnione podgrupy: pacjenci z celiakią na diecie bezglutenowej (CD-GFD), pacjenci z cukrzycą typu 1 i celiakią na diecie bezglutenowej (T1D-CD-GFD) i grupa kontrolna (HC).
- strona 34 Rycina 1. Wykres pudełkowy ilustrujący rozkład stężeń I-FABP w T1D, CD, T1D-CD i HC. T1D – pacjenci z cukrzycą typu 1, CD – pacjenci z celiakią, T1D-CD – pacjenci z cukrzycą typu 1 i celiakią, HC- grupa kontrolna; wartości p obliczone testem Kruskala-Wallisa.
- strona 34 Rycina 2. Wartość diagnostyczna I-FABP jako markera CD u pacjentów z T1D. AUC – pole pod krzywą, CI – przedział ufności.
- strona 35 Rycina 3. Wykres pudełkowy ilustrujący rozkład stężeń I-FABP u pacjentów z T1D-CD, T1D-CD-GFD i HC (A) oraz pacjentów z CD, CD-GFD i HC (B); Wartości p obliczone testem Wilcoxon dla par obserwacji; * p – T1D-CD (A) lub CD (B) vs. HC, ** p – T1D-CD (A) lub CD (B) vs. T1D-CD-GFD (A) lub CD-GFD (B). T1D-CD — pacjenci z cukrzycą typu 1 i celiakią, T1D-CD-GFD – pacjenci z cukrzycą typu 1 i celiakią na diecie bezglutenowej, HC – grupa kontrolna, CD – pacjenci z celiakią, CD – pacjenci z celiakią na diecie bezglutenowej.
- strona 35 Rycina 4. Stężenia I-FABP w grupie T1D-CD-1 w odniesieniu do pacjentów z T1D, HC i T1D-CD-GFD; wartości p obliczone testem Wilcoxon dla par obserwacji; kolory czcionek wartości p odpowiadają słupkom dla poszczególnych grup badawczych; * p — T1D-CD-1 lub T1D vs. HC, ** p — T1D-CD-1 lub T1D vs. T1D-CD-GFD. T1D-CD — pacjenci z cukrzycą typu 1

i celiakią z ujemnym wynikiem serologicznym CD rok przed rozpoznaniem CD, T1D — pacjenci z cukrzycą typu 1, HC — grupa kontrolna, T1D-CD-GFD — pacjenci z cukrzycą typu 1 i celiakią na diecie bezglutenowej, I-FABP — jelitowe białko wiążące kwasy tłuszczowe.

Ochocińska, A.; Wysocka-Mincewicz, M.; Świdorska, J.; Cukrowska, B. *Selected Serum Markers Associated with Pathogenesis and Clinical Course of Type 1 Diabetes in Pediatric Patients — The Effect of Disease Duration*. J. Clin. Med. 2023, 12, 2151.

- strona 42 Tabela 1. Charakterystyka biochemiczna podgrup T1D z uwzględnieniem czasu trwania T1D.
- strona 44 Tabela 2. Stężenia wybranych substancji czynnych u pacjentów z T1D i w grupie kontrolnej.
- strona 45 Rycina 1. Wybrane substancje czynne u pacjentów z T1D o różnym czasie trwania choroby i w grupie kontrolnej. IAPP – amyлина, proIAPP – proamyлина, CST – kastatyna, ChgA – chromogranina A, NGF – czynnik wzrostu nerwów, PAF – czynnik aktywujący płytki krwi, UMOD – uromodulina, I-FABP – jelitowe białko wiążące kwasy tłuszczowe, * – wartość $p \leq 0,05$, ** – wartość $p \leq 0,001$ i *** – wartość $p \leq 0,000001$.
- strona 53 Tabela S1: Wybrane markery u pacjentów z T1D o różnym czasie trwania choroby i w grupie kontrolnej — stężenia i istotność różnic.

Zgoda Komisji Bioetycznej

KOMISJA BIOETYCZNA
przy Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”
Al. Dzieci Polskich 20
04-730 Warszawa-Międzylesie
T. (22) 815-16-03

UCHWAŁA nr 18 /KBE/2019
OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ
przy INSTYTUCIE „POMNIK-CENTRUM ZDROWIA DZIECKA”

Komisja Bioetyczna przy Instytucie Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” na posiedzeniu w dniu **24.04.2019** rozpatrzyła badanie pt: **Znaczenie wybranych peptydów i białek biologicznie czynnych w przebiegu cukrzycy typu 1 u dzieci : wpływ przestrzegania i nieprzestrzegania ścisłej kontroli glikemii**

Gł. Badacz: mgr Agnieszka Ochocińska

Wniosek oraz Streszczenie protokołu badania

Cele naukowe projektu (praca doktorska):

- ocena wpływu ścisłego przestrzegania normoglikemii na stężenie we krwi wybranych substancji biochemicznych (wymienionych w protokole),
- ocena związku ścisłego przestrzegania normoglikemii z obniżeniem ryzyka wystąpienia powikłań cukrzycowych u dzieci/młodzieży chorych na cukrzycę typu 1,
- ocena potencjalnej przydatności diagnostycznej i prognostycznej wybranych do badań białek i peptydów biologicznie czynnych.

Czas trwania projektu: 2019-2021

Grupa badana: N=150

Dzieci i młodzież w wieku od 6 do 18 lat

- Grupa 1 (N~120) – dzieci z rozpoznana cukrzycą typu 1., czas trwania choroby > 3 lat; podział na 2 podgrupy (przed- i pokwitaniowa), w każdej po 30 chłopców i 30 dziewcząt,
- Grupa 2 (N~30) – dzieci z nowo rozpoznana cukrzycą typu 1., czas trwania choroby <3 miesiące

Grupa kontrolna: (N=30)

Dla wszystkich grup określono kryteria włączenia i wyłączenia.

Materiał i metody:

Jednorazowe pobranie 2,7 mL krwi obwodowej na skrzep (na czczo) od pacjentów z cukrzycą i z grupy kontrolnej. Po ~30 min krew zostanie odwirowana w odpowiednich warunkach; surowica zostanie podzielona na porce i zmrożona w temp. -20°C. Stężenia badanych substancji zostaną oznaczone metodą ELISA.

Analiza statystyczna z wykorzystaniem odpowiednich narzędzi.

Korzyści i ryzyko wynikające z prowadzenia badania

Udział w badaniu wiąże się z pobraniem 2,7 mL ml krwi żyłnej na skrzep.

Korzyści będą się wiązały z poszerzeniem wiedzy lekarzy na temat znaczenia ścisłej kontroli glikemii dla zapobiegania powikłaniom w przebiegu cukrzycy typu 1. Z uwagi na charakter choroby i liczbę osób w populacji nią dotkniętych wyniki badań mogą istotnie przyczynić się do poprawy metod diagnostyki i leczenia.

Kwalifikacje ośrodka prowadzącego badanie i doświadczenie badacza

Kompetencje kierownika projektu, pod kierunkiem którego diagnosta przeprowadzi badanie, jak również pozostałych wykonawców gwarantują realizację przyjętych założeń.

Informacja o prowadzonym badaniu dla pacjentów i ich opiekunów prawnych, formularz świadomej zgody na uczestniczenie w badaniu

Badacz dostarczył informacje pisemne dla Rodziców / Przedstawicieli prawnych dziecka oraz uczestników badania, jak również formularze Świadomej zgody wyszczególnione w pkt. 3 i 4. Poufność danych osobowych pacjenta
Informacja o poufnym traktowaniu i przetwarzaniu danych osobowych (anonimizacja próbek) – została uzupełniona.

Do zespołu badaczy należą:

Prof. dr hab. n med. Bożena Cukrowska
Dr n med Marta Wysocka –Mincewicz

Przedłożone dokumenty:

1. Wniosek do Komisji Bioetycznej o zaopiniowanie zgłaszanego badania z dnia 01.04.2019 (Załącznik nr 5 do Regulaminu Komisji Bioetycznej przy IPCZD)
2. Streszczenie protokołu badania
3. Formularze informacji pisemnej o badaniu (identycznej treści) dla uczestnika badania – pacjenta oraz dla uczestnika badania z grupy kontrolnej, w dwóch wersjach dla:
 - Rodziców / przedstawicieli ustawowych dziecka
 - Pacjenta w wieku 16-18 lat
4. Formularze świadomej zgody na udział w badaniu naukowym (identycznej treści) dla pacjentów z grupy badanej i grupy kontrolnej, w trzech wersjach (jw.):
 - dla Rodziców / przedstawicieli ustawowych dziecka
 - dla Pacjenta poniżej 16 r.ż.
 - dla Pacjenta w wieku 16-18 lat
5. Opinia Eksperta

Na podstawie przedłożonej dokumentacji, dodatkowych wyjaśnień przedstawionych przez mgr Agnieszkę Ochocińską oraz dyskusji i wyniku tajnego głosowania Komisja Bioetyczna przy IPCZD wyraziła zgodę na przeprowadzenie badania. Skład i działanie Komisji zgodne z GCP oraz wymogami lokalnymi. Tekst uchwały został sporządzony w 2 jednobrzmiących egz. po jednym dla wnioskodawcy i Komisji Bioetycznej. Lista członków Komisji biorących udział w posiedzeniu stanowi załącznik do niniejszego dokumentu.

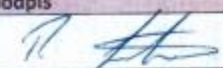
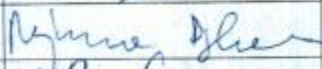
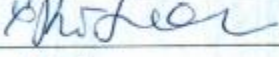
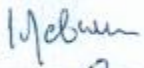
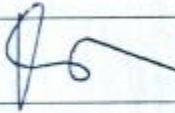
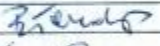
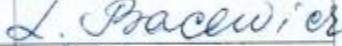
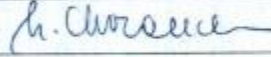

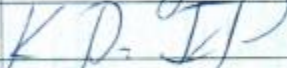
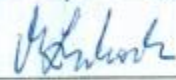



Z-ca PRZEWODNICZĄCEJ KOMISJI BIOETYCZNEJ
przy Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”
Mgr praw. Marcjanna Dębska

KOMISJA BIOETYCZNA

Przy Instytucie „Pomnik- Centrum Zdrowia Dziecka”
 Al. Dzieci Polskich 20
 04-730 Warszawa- Międzyzlesie
 e-mail : komisja.bioetyczna@ipczd.pl
 Tel: (22)815-16-03

24 04 2019
 posiedzenie w dniu.....

LISTA OBECNOŚCI

Lp.	Imię, nazwisko, zawód /specjalność, funkcja	podpis
1.	Prof. dr hab n hum Paweł Łuków Etyk	
2.	Mgr praw. Marcjanna Dębska Adwokat	
3.	Ks. Paweł Śmierchalski Teolog, Duszpasterstwo Służby Zdrowia	
4.	Dr hab., prof. APS Irena Jelonekiewicz-Sterianos psycholog	
5.	Prof. dr hab. n. med. Rafał Paluszkiewicz Lekarz (chirurg, transplantolog Kliniczny)- WUM, Okręgowa Rada Lekarska w Warszawie	
6.	Mgr. Piel Ewa Szkiela Pielęgniarka	
7.	Mgr. farm. Bożena Tondys	
8.	Dr n. med. Ludmiła Bacewicz Lekarz chirurg- IPCZD	
9.	Prof. dr hab. n med. Krystyna Chrzanowska Lekarz (pediatra, genetyk Kliniczny) - IPCZD	
10.	Prof. Dr hab. n. med. Katarzyna Kotulska-Józwiak Lekarz (neurolog, neurolog dziecięcy)- IPCZD	
11.	Prof. nadzw dr hab. n med. Katarzyna Dzierzanowska-Fangrat IPCZD	
12.	Dr n. med. Małgorzata Łyszkowska Lekarz (pediatra, transplantolog Kliniczny) - IPCZD	
13.	Prof. nadzw dr hab. n med. Wiesława Grajkowska IPCZD	
14.	Dr hab. n med. Sylwester Prokurat, prof. nadzw Lekarz (pediatra, nefrolog, transplantolog Kliniczny)- IPCZD	
15.	Prof. zw dr hab. n med Andrzej Piotrowski IPCZD	

Oświadczenia współautorów

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

Tytuł: *Autoantibodies against islet cell antigens - current diagnostic possibilities/ Autoprzeciwciała przeciwko antygenom komórek wysp trzustkowych – aktualne możliwości diagnostyczne*

Autorzy: Ochocińska Agnieszka, Wysocka-Mincewicz Marta, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **Diagn Lab. 2022; 58 (3): 114-119**

Autor: Wysocka-Mincewicz Marta

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na merytorycznej recenzji artykułu.

Wkład w powstanie pracy wynosi: 5 %

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Małgorzaty Ochocińskiej.

Data:14.06.2023.....

Podpis: ...*Wysocka-Mincewicz*.....

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

TUTUŁ: *Autoantibodies against islet cell antigens - current diagnostic possibilities/
Autoprzeciwciała przeciwko antygenom komórek wysp trzustkowych – aktualne możliwości
diagnostyczne*

AUTORZY: Ochocińska Agnieszka, Wysocka-Mincewicz Marta, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **Diagn Lab. 2022; 58 (3): 114-119**

AUTOR: Cukrowska Bożena

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na merytorycznej recenzji artykułu.

Wkład w powstanie pracy wynosi: 5 %

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki
Małgorzaty Ochocińskiej

Data: 15.06.2023

Podpis: 

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

TYTUŁ: *Could I-FABP Be an Early Marker of Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes? Retrospective Study from the Tertiary Reference Centre*

AUTORZY: Ochocińska Agnieszka, Wysocka-Mincewicz Marta, Groszek Artur, Rybak Anna, Konopka Ewa, Bierła Joanna Beata, Trojanowska Ilona, Szalecki Mieczysław, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **Nutrients, 2022, 14, 414**

AUTOR: **Wysocka-Mincewicz Marta**

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na pozyskaniu danych do pracy oraz merytorycznej recenzji artykułu.

Wkład w powstanie pracy wynosi: 10%.

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Małgorzaty Ochocińskiej.

Data: ...*14.06.2023*.....

Podpis: ...*M. Wysocka-Mincewicz*.....

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

TUTUŁ: *Could I-FABP Be an Early Marker of Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes? Retrospective Study from the Tertiary Reference Centre*

AUTORZY: Ochocińska Agnieszka, Wysocka-Mincewicz Marta, Groszek Artur, Rybak Anna, Konopka Ewa, Bierła Joanna Beata, Trojanowska Ilona, Szalecki Mieczysław, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **Nutrients, 2022, 14, 414**

AUTOR: **Groszek Artur**

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na pozyskaniu i przechowywaniu danych do pracy, pozyskaniu funduszy.

Wkład w powstanie pracy wynosi: 5%.

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Małgorzaty Ochocińskiej.

Data: *14.06.2023*

Podpis: *Groszek Artur*

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

TUTUL: *Could I-FABP Be an Early Marker of Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes? Retrospective Study from the Tertiary Reference Centre*

AUTORZY: Ochocińska Agnieszka, Wysocka-Mincewicz Marta, Groszek Artur, Rybak Anna, Konopka Ewa, Bierła Joanna Beata, Trojanowska Ilona, Szalecki Mieczysław, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **Nutrients, 2022, 14, 414**


AUTOR: Rybak Anna

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na pozyskaniu danych do pracy oraz korekcie języka angielskiego.

Wkład w powstanie pracy wynosi: 2%.

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Małgorzaty Ochocińskiej.

Data: 15/06/2023

Podpis: 

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKULU

TUTUL: *Could I-FABP Be an Early Marker of Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes? Retrospective Study from the Tertiary Reference Centre*

AUTORZY: Ochocińska Agnieszka, Wysocka-Mincewicz Marta, Groszek Artur, Rybak Anna, Konopka Ewa, Bierła Joanna Beata, Trojanowska Ilona, Szalecki Mieczysław, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **Nutrients, 2022, 14, 414**

AUTOR: **Konopka Ewa**

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na wykonaniu części oznaczeń laboratoryjnych, przechowywaniu, analizie i interpretacji danych.

Wkład w powstanie pracy wynosi: 5%.

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Małgorzaty Ochocińskiej.

Data: 14. 06 2023

Podpis: E. Konopka

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKULU

TUTUL: *Could I-FABP Be an Early Marker of Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes? Retrospective Study from the Tertiary Reference Centre*

AUTORZY: Ochocińska Agnieszka, Wysocka-Mincewicz Marta, Groszek Artur, Rybak Anna, Konopka Ewa, Bierła Joanna Beata, Trojanowska Ilona, Szalecki Mieczysław, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **Nutrients, 2022, 14, 414**

AUTOR: **Bierła Joanna Beata**

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowaniu metodologii, wykonaniu części oznaczeń laboratoryjnych.

Wkład w powstanie pracy wynosi: 6 %

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Małgorzaty Ochocińskiej.

Data: *14.06.2023r.*

Podpis: *Joanna Bierła*

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

TUTUŁ: *Could I-FABP Be an Early Marker of Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes? Retrospective Study from the Tertiary Reference Centre*

AUTORZY: Ochocińska Agnieszka, Wysocka-Mincewicz Marta, Groszek Artur, Rybak Anna, Konopka Ewa, Bierła Joanna Beata, Trojanowska Ilona, Szalecki Mieczysław, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **Nutrients, 2022, 14, 414**

AUTOR: **Trojanowska Ilona**

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na wykonaniu części oznaczeń laboratoryjnych, przechowywaniu, analizie i interpretacji danych.

Wkład w powstanie pracy wynosi: 5%

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Małgorzaty Ochocińskiej.

Data:14.06.2023.....

Podpis:Ilona Trojanowska.....

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKULU

TUTUL: *Could I-FABP Be an Early Marker of Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes? Retrospective Study from the Tertiary Reference Centre*

AUTORZY: Ochocińska Agnieszka, Wysocka-Mincewicz Marta, Groszek Artur, Rybak Anna, Konopka Ewa, Bierła Joanna Beata, Trojanowska Ilona, Szalecki Mieczysław, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **Nutrients, 2022, 14, 414**

AUTOR: **Szalecki Mieczysław**

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na merytorycznej recenzji artykułu.

Wkład w powstanie pracy wynosi: 2 %.

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Małgorzaty Ochocińskiej.

Data: 15.06.2023

Podpis: Mieczysław Szalecki

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKULU

TUTUL: *Could L-FABP Be an Early Marker of Celiac Disease in Children with Type 1 Diabetes? Retrospective Study from the Tertiary Reference Centre*

AUTORZY: Ochocińska Agnieszka, Wysocka-Minoewicz Marta, Groszek Artur, Rybak Anna, Konopka Ewa, Bierała Joanna Beata, Trojanowska Iлона, Szalecki Mieczysław, Cukrowska Beżena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **Nutrients, 2022, 14, 4114**

AUTOR: Cukrowska Beżena

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowywaniu koncepcji pracy oraz metodologii badań, pozyskaniu funduszy, analizie formalnej treści oraz merytorycznej recenzji artykułu.

Wkład w powstanie pracy wynosi: 15 %

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Małgorzaty Ochocińskiej

Data: 15.06.2023

Podpis: 

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

TUTUŁ: *Selected Serum Markers Associated with Pathogenesis and Clinical Course of Type 1 Diabetes in Pediatric Patients – The Effect of Disease Duration*

AUTORZY: Ochocińska Agnieszka, Wysocka-Mincewicz Marta, Świdarska Jolanta, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **J. Clin. Med. 2023, 12, 2151**

AUTOR: Wysocka-Mincewicz Marta

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na pozyskaniu danych do pracy, opracowaniu metodologii badania oraz merytorycznej recenzji artykułu.

Wkład w powstanie pracy wynosi: 10%.

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Małgorzaty Ochocińskiej.

Data: 14.06.2023

Podpis: M. Wysocka-Mincewicz

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

Tytuł: *Selected Serum Markers Associated with Pathogenesis and Clinical Course of Type 1 Diabetes in Pediatric Patients – The Effect of Disease Duration*

Autorzy: Ochocińska Agnieszka, Wysocka-Mincewicz Marta, Świdarska Jolanta, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **J. Clin. Med. 2023, 12, 2151**

Autor: Świdarska Jolanta

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na pozyskaniu oraz przechowywaniu danych do pracy oraz przygotowywaniu treści manuskryptu.

Wkład w powstanie pracy wynosi: 5 %

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Małgorzaty Ochocińskiej.

Data: 14.06.2023

Podpis: J. Świdarska

LEKARZ
Jolanta Świdarska
Specjalista pediatria
specjalista diabetolog
258 66 50

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA
O INDYWIDUALNYM WKŁADZIE PRACY W POWSTAWANIE ARTYKUŁU

TUTUŁ: *Selected Serum Markers Associated with Pathogenesis and Clinical Course of Type 1 Diabetes in Pediatric Patients – The Effect of Disease Duration*

AUTORZY: Ochocińska Agnieszka, Wysocka-Mincewicz Marta, Groszek Artur, Rybak Anna, Konopka Ewa, Bierła Joanna Beata, Trojanowska Ilona, Szalecki Mieczysław, Cukrowska Bożena

czasopismo lub wydawca, rok wydania, tom, strony: **J. Clin. Med. 2023, 12, 2151**

AUTOR: Cukrowska Bożena

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy polegał na opracowywaniu koncepcji pracy oraz metodologii badań, pozyskaniu funduszy, analizie formalnej treści oraz merytorycznej recenzji artykułu.

Wkład w powstanie pracy wynosi: 15 %

Wyrażam zgodę, żeby publikacja ta była częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Małgorzaty Ochocińskiej

Data: .....

Podpis: 15.06.2023.....