

Bogna Wierusz-Wysocka, Aleksandra Araszkiwicz, Judyta Schlaffke

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Diabetologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Końcowe produkty glikacji — nowy biomarker cukrzycy i jej powikłań?

Advanced glycation end products. A new biomarker of diabetes and late complications of disease?

STRESZCZENIE

Od czasu badania *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) rolę biomarkera przewlekłych powikłań cukrzycy odgrywa hemoglobina glikowana (HbA_{1c}). W ostatnich latach zwraca się uwagę, że jej oznaczenia nie w pełni odzwierciedlają rzeczywisty przebieg choroby. Dlatego też poszukuje się innego, bardziej precyzyjnego biomarkera pozwalającego na monitorowanie cukrzycy, między innymi wykorzystującego zjawisko tworzenia końcowych produktów nasilonej glikacji (AGEs). Ostatnio pojawiły się nowe możliwości nieinwazyjnej oceny zjawiska nasilonej glikacji za pomocą oznaczeń fluorescencji kolagenu w skórze. W kilku badaniach wykazywano dodatnią zależność między autofluorescencją skóry, średnią wartością HbA_{1c} i obecnością powikłań mikronaczyniowych u osób chorych na cukrzycę. Wydaje się, że w przyszłości zwiększy się wykorzystywanie tego zjawiska do monitorowania przebiegu cukrzycy. (*Diabet. Klin.* 2013; 2, 3: 96–103)

Słowa kluczowe: cukrzyca, końcowe produkty glikacji, biomarker, autofluorescencja skóry

Adres do korespondencji:

dr n. med. Aleksandra Araszkiwicz
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Diabetologii,
UM im. Karola Marcinkowskiego
ul. Mickiewicza 2, 60-834 Poznań
Tel./faks: +48 (61) 847 45 79
e-mail: olaaraszkiewicz@interia.pl
Diabetologia Kliniczna 2013, tom 2, 3, 96–103
Copyright © 2013 Via Medica

Nadesłano: 18.02.2013

Przyjęto do druku: 28.04.2013

ABSTRACT

Since DCCT study HbA_{1c} plays the role of biomarker of late diabetes complications. In the last years however it has been suggested that HbA_{1c} does not exactly reflect true course of the disease. Therefore, intensive efforts are made to find other, more precise tools for monitoring the metabolic state of diabetic patients. Estimations of advanced glycation end-products (AGEs) in serum or tissues seems to be one of the options. New possibility of non-invasive assessment of AGEs is provided by the use of skin collagen fluorescence. In several studies in diabetic patients the positive correlation between skin autofluorescence, HbA_{1c} value and microvascular complications was reported. It seems that in the future this phenomenon could be used as a useful method for clinical monitoring of diabetes course. (*Diabet. Klin.* 2013; 2, 3: 96–103)

Key words: diabetes, advanced glycation end products, biomarker, skin autofluorescence

Wstęp

Do oceny przebiegu przewlekłej choroby konieczne jest jej stałe monitorowanie. Niezbędny dla tych celów staje się więc względnie stabilny wskaźnik umożliwiający wgląd w postępowanie choroby. W cukrzycy od czasu badania *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) taką rolę odgrywa hemoglobina glikowana (HbA_{1c}) [1]. W ostatnich latach coraz częściej pojawiają się jednak wątpliwości dotyczące jej przydatności dla długoterminowego monitorowania stanu wyrównania metabolicznego cukrzycy, a tym samym dla prewencji

przewlekłych powikłań choroby. Nie odzwierciedla ona bowiem w pełni rzeczywistego przebiegu schorzenia [2, 3]. Poszukuje się więc innego biomarkera pozwalającego na bardziej jednoznaczne monitorowanie przebiegu cukrzycy i przewidywanie rozwoju jej powikłań. Pojęcie biomarkera wprowadzono w 2011 roku wraz z definicją: „Biomarkerem może być biologiczna cząsteczka znajdująca się we krwi, innych płynach ustrojowych lub tkankach, która jest znacznikiem prawidłowego lub nieprawidłowego procesu lub choroby. Może być wykorzystany do oceny odpowiedzi ustroju na leczenie” [4, 5].

W latach 70. XX wieku Koenig i Cerami [6] po raz pierwszy zwrócili uwagę, że u chorych na cukrzycę w miarę wzrostu stężenia glukozy rośnie zawartość we krwi HbA_{1c}. Autorzy ustalili wówczas strukturę molekularną tej cząsteczki i stwierdzili, że jest to typowy produkt Amadori, związek powstający w wyniku nieenzymatycznego łączenia cząsteczki glukozy z cząsteczką białka [6]. Monitorowanie przebiegu cukrzycy za pomocą HbA_{1c} po raz pierwszy na szeroką skalę wykorzystano w badaniu DCCT [7]. Jednakże od tego czasu coraz częściej zwracano uwagę na fakt, że wartość tego parametru tylko uśrednia dobowe stężenia glukozy we krwi. Nie odzwierciedla więc stanów hipoglikemii ani też dużych dobowych wahań glikemii, które — jak się okazało — odgrywały niebagatelną rolę w rozwoju przewlekłych powikłań, zwłaszcza retinopatii i neuropatii cukrzycowej [8, 9]. Przejściowa, krótkotrwała hiperglikemia, niewpływająca na zachowanie się wartości HbA_{1c}, aktywuje bowiem długotrwałe zmiany epigenetyczne w komórkach śródbłonna. Dotyczą one podjednostki p65, promotora prozapalnego czynnika jądrowego NFκB. Zmiany te utrzymują się nawet w warunkach następnej normoglikemii. Pod wpływem zwiększonej ekspresji genu p65 i nasilonej wówczas ekspresji NFκB dochodzi do uwalniania prozapalnych cytokin i zwiększonej ekspresji molekuł adhezyjnych na powierzchni komórek śródbłonna. Na podstawie tych spostrzeżeń zrozumiałe stają się więc wyniki wcześniejszych badań Rosenstocka i Raskina [10], którzy w grupie około 25% dzieci z cukrzycą typu 1 zaobserwowali rozwój przewlekłych powikłań cukrzycy mimo dobrej kontroli metabolicznej schorzenia. Dlatego też ostatnio coraz częściej podejmuje się próby wykorzystania do monitorowania cukrzycy innych niż HbA_{1c} produktów glikacji [11]. Znaczenie prognostyczne w tym zakresie przypisuje się w cukrzycy oznaczeniom dwuwęglowych produktów glikacji, takim jak pentozydyna czy N-carboksymetyl-lizyna [12, 13]. Wydaje się jednak, że najbardziej obiecujące są możliwości wykorzystania dla tych celów stabilnych, długo żyjących produktów nasilonej glikacji (AGEs, *advanced glycation end pro-*

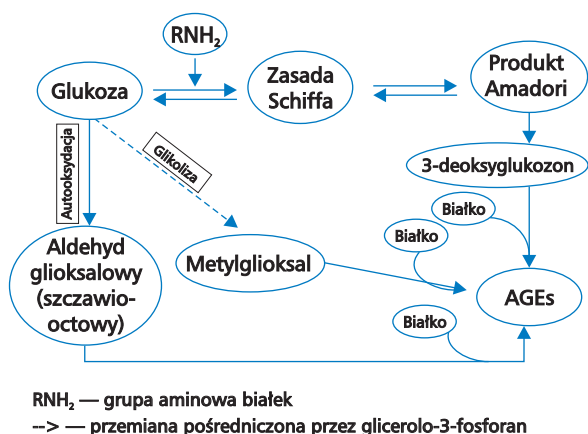
ducts). Wiadomo bowiem, że stosunkowo krótki okres półtrwania glikowanej hemoglobiny, a także reaktywnych dwuwęglowych pochodnych glikacji dodatkowo utrudnia traktowanie ich jako biomarkera przebiegu cukrzycy. Pojawiły się ostatnio doniesienia, że HbA_{1c} ma znaczenie prognostyczne dopiero wówczas, gdy bierze się pod uwagę średnią wyliczoną z jej oznaczeń dokonywanych w ciągu wielu lat [14]. Spostrzeżenia te potwierdzono w niepublikowanych jeszcze w wynikach Poznańskiego Badania Prospektywnego.

Zjawisko nieenzymatycznej glikozylacji białek (glikacji)

Enzymatyczna glikozylacja białek w ustroju jest procesem celowym, zachodzącym w określonym miejscu. Glikacja (nieenzymatyczna glikozylacja) ma natomiast charakter spontaniczny, a jej nasilenie zależy od zawartości w organizmie cukrów prostych, w tym glukozy. Zjawisko glikacji białek jest znane od ponad 100 lat. W 1912 roku Louis Camille Maillard po raz pierwszy opisał reakcję spontanicznego łączenia między aminokwasami a cukrami prostymi i określił ją jako reakcję brązowienia. Początkowo sądzono, że proces ten wiąże się wyłącznie z odżywianiem. W latach 80. XX wieku Cerami i wsp. [15] zwrócili uwagę, że zjawisko nasilonej glikacji nierozłącznie wiąże się z procesem starzenia się komórek i tkanek. Ponieważ wpływ cukrzycy na stan ustroju określano jako „przyspieszony proces starzenia”, wiele badań skupiających uwagę na procesach glikacji dotyczyło tej grupy osób [16]. Pozwoliły one ustalić, że reakcje te prowadzą do powstawania sieci powiązań białkowych. Ujawniły również obecność związków między zjawiskami nasilonej glikacji białek, nukleotydów i lipidów w warunkach hiperglikemii a rozwojem uszkodzeń narządowych, zwłaszcza ściany naczyniowej i nerwów. Obecnie wiadomo, że AGEs powodują destrukcję wielu struktur komórkowych — zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio — przez indukowanie stresu oksydacyjnego i zjawiska gliko- oraz lipooksydacji [17].

Poza- i wewnątrzkomórkowe zjawisko glikacji

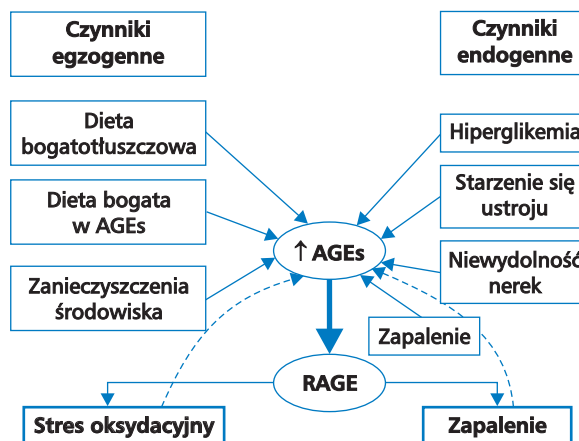
Nasilony proces nieenzymatycznej glikacji białek, nukleotydów i lipidów, zachodzący w warunkach ponadfizjologicznych stężeń glukozy we krwi, charakteryzuje się tworzeniem kowalentnych wiązań między grupą aldehydową cukrów a grupą aminową białek (reakcja „brązowienia” Maillarda). Powstająca wówczas zasada Schiffa jest formą niestabilną i szybko przekształca się do związku Amadori. Jego dalszy rozpad prowadzi z kolei do powstania dwuwęglowej pochodnej — 3-deoksuglukozonu. Tworzenie dwuwęglowych (dwukarbonylowych) pochodnych może być także



Rycina 1. Szlaki metaboliczne prowadzące do tworzenia końcowych produktów glikacji (AGEs, *advanced glycation end products*)

następstwem zachodzącej w warunkach glikacji auto-oksydacji glukozy do aldehydu szczawiooctowego i/lub fragmentacji glicerolo-3-fosforanu do metylglioksalu [18]. Te trzy dwuwęglowe związki są silnie reaktywne, dlatego też łatwo wchodzą w reakcję z grupami aminowymi białek, tworząc, w wyniku oksydatywnej lub nieoksydatywnej glikacji, AGEs (ryc. 1). Tak więc aldehyd szczawiooctowy (glioksal), metylglioksal oraz 3-deoksyglukozon z jednej strony stają się prekursorami tworzenia nieodwracalnych AGEs, z drugiej strony są substratami dla działania wielu reduktaz i rozwoju zaburzeń równowagi oksydacyjno-redukcyjnej (określanej jako stres oksydacyjny) [19]. W następstwie drugiego z tych procesów dochodzi do oksydacji glukozy (gliko-oksydacja) i lipidów (lipooksydacja), a tym samym do modyfikacji wielu biologicznych cząsteczek. Współistnienie zjawisk glikacji, gliko-oksydacji i lipooksydacji, obserwowanych w warunkach hiperglikemii, określono jako *carbonyl stress* [20].

Łącząc się między sobą i z długo żyjącymi białkami, AGEs tworzą sieć krzyżowych powiązań, a tym samym zaburzają czynność większości komórek i tkanek ustroju. Z kolei w wyniku związania się AGEs ze swoistym receptorem dla nasilonych produktów glikacji (RAGE, *receptor for advanced glycation end-products*) na powierzchni komórek zaburzają one ich czynność (ryc. 2). Obecność RAGE wykazano na powierzchni komórek śródbłonna, komórek mięśni gładkich, monocytach/makrofagach, limfocytach T, podocytach kłębków nerkowych, kardiomiocytach, komórkach dendrytycznych, neuronach centralnego i obwodowego układu nerwowego oraz komórek transformujących [21]. Związanie AGE ze swoistym receptorem staje się sygnałem dla wewnątrzkomórkowego tworzenia reaktywnych pochodnych tlenu i aktywacji czynników



Rycina 2. Uproszczony schemat tworzenia końcowych produktów glikacji (AGEs, *advanced glycation end products*) i ich rola w ustroju; RAGE (*receptor for advanced glycation end-products*) — receptory dla nasilonych produktów glikacji

transkrypcyjnych. W następstwie rozwijającego się w komórkach stresu oksydacyjnego dochodzi do aktywacji prozapalnego czynnika transkrypcyjnego NFκB, a także do aktywacji szlaków sygnałowych, między innymi MAP-kinazy, NJK i p21RAS [22]. W tych warunkach nasila się również produkcja wielu cytokin oraz czynników wzrostu [23]. Poprzez aktywowanie różnych reduktaz, między innymi reduktazy aldozy, zachodzące zjawiska przyspieszają tworzenie dalszych końcowych produktów glikacji i nasilają zjawisko stresu karbonylowego. Dochodzi także do nasilenia ekspresji molekuł adhezyjnych (ICAM, *intracellular adhesion molecule*; VCAM, *vascular cell adhesion molecule*) [24, 25].

Procesom glikacji są poddawane nie tylko grupy aminowe białek i nukleotydów. Także lipidy mają grupy aminowe. Szczególnie fosfatydylocholiny łatwo łączą się z grupą aldehydową cukrów prostych [26]. Takich skłonności nie wykazuje fosfatydylocholina wchodząca również w skład błony komórkowej. Glikacja lipidów błon komórkowych przyczynia się do ich zwiększonej przepuszczalności. Rozwijający się w komórkach pod wpływem hiperglikemii stres oksydacyjny odpowiada z kolei za zjawisko peroksydacji lipidów [27]. Stają się one wówczas dodatkowym źródłem wysoce reaktywnych dwuwęglowych pochodnych glikacji [28]. Glikacja kwasów nukleinowych i towarzyszący jej stres oksydacyjny są odpowiedzialne za rozrywanie skręconych łańcuchów DNA, sprzyjają mutacji genów i zaburzają zjawisko transkrypcji [29–31]. Proces glikacji może również dotyczyć wielu enzymów. Wiadomo na przykład, że w następstwie glikacji kinazy kreatyninowej przez glioksal ulega ona inaktywacji. Również własność innych enzymów może się zmienić w następstwie modyfikacji grup tiolowych, reszt lizynowych i argininowych.

Uszkodzenia wywołane procesem glikacji są ograniczane na różnych etapach. Najważniejszą w tym zakresie rolę odgrywają glioksyłaza 1 i 2, biorące udział w usuwaniu reaktywnych związków dwuwęglowych (metylglioksal i glioksal), co tym samym ogranicza ich destrukcyjne działanie [32]. Kofaktorem glioksyłazy 1 jest zredukowany glutation. Wchodzi on w skład jednego z najważniejszych układów antyoksydacyjnych ustroju [glutation (GSS) — zredukowany glutation (GSH)]. Zrozumiałe jest więc, że w warunkach hiperglikemii i towarzyszącego jej stresu oksydacyjnego aktywność układu GSS–GSH stopniowo się wyczerpuje. Do regeneracji zredukowanego glutationu niezbędna jest bowiem obecność zredukowanego dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH, *reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), do którego zużycia dochodzi w warunkach stresu oksydacyjnego [33]. Ograniczona regeneracja GSH odpowiada za zmniejszenie możliwości usuwania silnie reaktywnych związków dwuwęglowych będących prekursorem AGEs. Z procesem tym wiąże się ściśle mniejsza biodostępność tlenu azotu (NO) [34]. Detoksyfikacyjną rolę w tych procesach przypisuje się również reduktazie aldozy. Enzym ten redukuje cząsteczki dwuwęglowe do alkoholu. Zasadniczym miejscem jego działania jest tor polioliowy, alternatywny do glikolitycznego szlak przemiany glukozy. Wykorzystywanie reduktazy aldozy w procesach detoksyfikacji w przebiegu nasilonej glikacji ogranicza jego aktywność w przemianie glukozy torem polioliowym, a tym samym zaburza aktywność antyoksydacyjnego układu GSS–GSH, ściśle powiązanego z tym szlakiem metabolicznym. Można więc sugerować, że nasilona produkcja AGEs i ich dwuwęglowych prekursorów w warunkach przewlekłej hiperglikemii ogranicza możliwości działania układów antyoksydacyjnych ustroju. Do enzymów detoksyfikujących związki dwukarboksylowe zalicza się również dehydrogenazę aldehydową, która przekształca je do pirogronianu i mleczanu [35].

W warunkach fizjologicznych istnieją w ustroju również inne systemy antyglikacyjne ograniczające zaburzenia czynności i struktury komórek. Należą do nich lizosomy i proteosomy, które zapobiegają gromadzeniu się wewnątrzkomórkowo glikowanych białek [36]. Oczyszczanie lipidów ze związków glikujących umożliwia natomiast szybki *turn over* tych cząsteczek. Odcinający system naprawczy usuwa z kolei związki glikujące z nukleotydów. Do czasu utrzymania równowagi ustrojowej między produkcją prekursorów glikacji a systemem je usuwającym nie dochodzi do uszkodzeń komórek i tkanek. W warunkach hiperglikemii oraz zazwyczaj towarzyszącej jej hiperlipidemii procesy glikacji nasilają się, przyczyniając się do rozwoju

stresu metabolicznego, tworzenia AGEs i rozwoju poglikacyjnej destrukcji komórek i tkanek.

Kliniczne znaczenie zjawiska nasilonej glikacji

Krzyżowe, za pośrednictwem AGEs wiązanie białek — zwłaszcza o długim okresie życia — zaburza ich strukturę. Stają się one wówczas odporne na proteolizę, co tym samym przyspiesza proces ich starzenia. W następstwie glikacji kolagenu IV, odpowiedzialnego za strukturę błony podstawnej, jest znacznie spowolniony jego *turn over*. Natomiast glikacja oraz krzyżowe wiązania kolagenu I i proteoglikanu powodują, że ich włókna stają się sztywne i mało elastyczne [37]. Tak więc glikacja białek błony podstawnej odpowiada za utratę elastyczności ściany naczyniowej, zjawiska typowego dla niewyrównanej metabolicznie cukrzycy. Zmiana ładunku białek w tych warunkach może powodować agregację krystaliny soczewki i przyczyniać się do rozwoju zaćmy. Glikacji białek przypisuje się również dezintegrację komórek śródbłonna z pozakomórkowym matriks, a tym samym utratę powiązań między nimi a błoną wewnętrzną ściany naczyniowej. Sprzyjać to może zarówno tworzeniu blaszki miażdżycowej, jak i rozwojowi mikroangiopatii cukrzycowej. Glikacja lipoprotein błon komórkowych zwiększa ich przepuszczalność, ułatwia peroksydację lipidów, a w następstwie stwarza warunki do rozwoju oksydacyjnych uszkodzeń struktur wewnątrzkomórkowych. Zwiększona przepuszczalność błon komórkowych sprzyja z kolei dyfundowaniu reaktywnych dwuwęglowych pochodnych glikacji, zarówno do wnętrza samej komórki, jak i jej mitochondriów. W cytoplazmie stają się one źródłem wewnątrzkomórkowego tworzenia AGEs, które zaburzają czynność komórek. Natomiast gromadzenie dwuwęglowych pochodnych glikacji w mitochondriach upośledza toczące się tam procesy oddechowe i energetyczne [11, 17, 23]. Dochodzi również do uszkodzeń DNA i aktywacji poli(ADP-ribose)-polimerazy [38, 39]. Zaburzenia te odpowiadają za zmiany czynności komórek i składu podścieliska ściany naczyniowej, co zmienia jej biologiczne własności. Czynią ją także bardziej podatną na uszkodzenia wywołane zarówno hiperglikemią, jak i metaboliczną hipoksją. Wiadomo, że w warunkach nasilonej glikacji i towarzyszącego jej stresu oksydacyjnego zostaje też zaburzona czynność wielu komórek, między innymi komórek śródbłonna, fibroblastów, monocytów/makrofagów, granulocytów, limfocytów T, a więc komórek biorących aktywny udział w rozwoju przewlekłego procesu zapalnego w obrębie ściany naczyniowej [40, 41].

Obecnie wiadomo już, że glikacyjne oraz oksydacyjne uszkodzenia komórek i tkanek są odpowiedzialne

za rozwój i progresję przewlekłych powikłań cukrzycy. Ostatnio sugeruje się, że mogą one prowadzić także do rozwoju insulinooporności. Wykazano bowiem, że stężenie AGEs w surowicy koreluje z insulinoopornością ocenianą za pomocą wskaźnika HOMA IR. Zależność ta utrzymywała się nawet po wykluczeniu wpływu wieku, wskaźnika masy ciała, obwodu talii, palenia tytoniu oraz wykładników stresu oksydacyjnego i zapalenia [42]. Diamanti-Kandarakis i wsp. [43] stwierdzili występowanie podobnych zależności u kobiet z zespołem policystycznych jajników. Sugeruje się, że przyczyną tego zjawiska może być glikacja insuliny zmieniająca jej biologiczne własności. Boyd i wsp. [44] wykazali bowiem w warunkach *in vitro*, że pojedyncza glikacyjna modyfikacja fenyloalaniny łańcucha B insuliny powoduje zmniejszenie jej aktywności o około 20%. Podobne obserwacje poczynili także inni autorzy [45] oceniający aktywność monoglikowanej insuliny za pomocą klamry hiperinsulinemiczno-euglikemicznej. W swoich badaniach Jia i wsp. [46] wykazali z kolei, że także modyfikacja argininy przez metylgliksal redukuje utylizację glukozy przez adipocyty i komórki mięśniowe. W dalszych badaniach w tym zakresie ujawniono blokowanie przez zjawisko glikacji fosforylacji tyrozyny substratu receptora insulinowego (IRS, *insulin receptor substrate*) oraz aktywację fosfoinozytydo-3-kinazy białkowej w hodowli komórek β wysp trzustki. W tych warunkach dochodziło także do tworzenia agregatów insuliny [47, 48]. Wykazano również, że zjawisko glikacji zwiększa produkcję TNF α , który wpływa na hamowanie sygnału insulinowego w komórkach [49]. Na podstawie tych badań Goglucci [50] wysunął hipotezę, że metylgliksal, modyfikując AMP-kinazę, może powodować dysfunkcję komórek. Zmniejszenie bowiem jej aktywności zaburza wewnątrzkomórkowe procesy energetyczne, co prowadzi między innymi do nasilenia w wątrobie glukogenezy i lipogenezy, zaburzeń typowych dla zjawiska insulinooporności. Nie można w rozwoju insulinooporności wykluczyć również udziału glikacji innych cząsteczek wpływających na biogenezę w mitochondriach. W badaniach eksperymentalnych z użyciem otyłych zwierząt doświadczalnych z cukrzycą typu 2 wykazano z kolei istnienie prostej zależności między stężeniem insuliny a AGEs w surowicy. Zastosowanie piridoksaminy, inhibitora tworzenia AGEs, powodowało obniżenie stężenia insuliny na czczo oraz poprawę wrażliwości tkanek na jej działanie w sposób zależny od dawki [51]. Na negatywny wpływ nie tylko hiperglikemii, lecz również hiperinsulinemii w rozwoju insulinooporności w cukrzycy typu 2, a także w patogenezie powikłań naczyniowych już wcześniej zwracali uwagę badacze z zespołu Brownleego [52]. Wykazali oni bowiem, że hiperinsulinemia nasila aktywność prozapalnego jądrowego

czynnika transkrypcyjnego NF κ B indukowanego zarówno przez hiperglikemię, jak i AGEs w komórkach mięśni gładkich ściany naczyniowej.

Zjawisko nasilonej glikacji charakteryzuje nie tylko cukrzycę. Dowodzi się, że jest ono również odpowiedzialne: za uszkodzenia mięśnia sercowego rozwijające się w wyniku zjawisk towarzyszących niedotlenieniu z następową reperfuzją, za zjawisko restenozy u osób poddawanych interwencji kardiologicznej, a także za ryzyko rozwoju i progresji niewydolności serca [53]. Ostatnio wykazano, że dysfunkcja rozkurczowa lewej komory u osób w podeszłym wieku, niezależnie od zmian strukturalnych mięśnia sercowego, koreluje ze stężeniem osocznego AGEs [54]. Sugeruje się także, że podwyższone wartości produktów nasilonej glikacji stanowią czynnik ryzyka zwiększonej śmiertelności z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego, zarówno u osób chorych na cukrzycę typu 2, jak i typu 1 [55, 56]. Podwyższone stężenie AGEs wydaje się także związane z chorobą Parkinsona [5]. Wskazuje się również na ich związek z niektórymi postaciami nowotworów oraz z neurodegeneracją typową dla choroby Alzheimera [57].

Trwają intensywne poszukiwania, oprócz wyrównania metabolicznego cukrzycy, skutecznych metod zmniejszania glikacyjnych oraz oksydacyjnych uszkodzeń komórek i tkanek. Na podstawie wielu badań wiadomo bowiem, że przynajmniej częściowo jest to zjawisko odwracalne. Wykazano korzystne działanie w tym zakresie kwasu liponowego, benfogammy, a ostatnio Zhan i wsp. [58] zaobserwowali, że w warunkach *in vitro* glukogonopodobny peptyd-1 (GLP-1), hamując apoptozę komórek ściany naczyniowej indukowanej przez AGE, zapobiega glikacyjnemu uszkodzeniu komórek śródbłonna. Podobne korzyści w tym zakresie przynosi także wysiłek fizyczny. Sugeruje się również, że blokada RAGE może wpływać na ograniczenie niekorzystnych następstw zjawiska glikacji [59].

Możliwości oznaczeń biomarkerów cukrzycy i jej powikłań

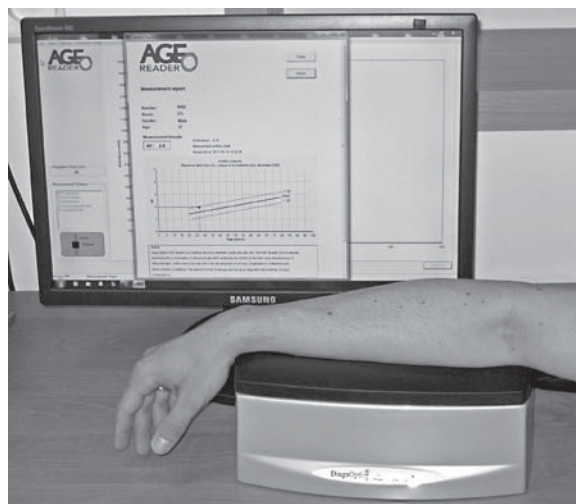
Od dawna wiadomo, że jednym z pierwszych, uchwytłych wykładników zaburzeń czynności ściany naczyniowej jest zmniejszenie jej elastyczności. Można ją wykazać za pomocą oceny prędkości fali tętna w małych naczyniach tętniczych (*pulse wave analysis*). W wielu badaniach sugerowano, że jej zmniejszenie może służyć jako biomarker sztywności naczyń i dysfunkcji śródbłonna w cukrzycy [11].

Innym biomarkerem cukrzycy i jej powikłań może być pomiar mikrokrążenia siatkówki metodą laser Doppler wraz z równoczesną oceną stężenia cholesterolu frakcji LDL w surowicy. Na podstawie wyników *Reti-*

nal Laser Doppler Velicimetry Study wykazano bowiem, że przedkliniczny stan retinopatii negatywnie koreluje ze stężeniem cholesterolu frakcji LDL [60]. Zmiany te wydają się następstwem intensywnego wycieku lipoprotein poza łożysko naczyniowe, najprawdopodobniej w następstwie obkurczania się pericytów kapilarów siatkówki w warunkach hiperglikemii.

Jeśli traktować AGEs w surowicy jako nowy biomarker schorzenia, to celowa byłaby ocena ich stężenia za pomocą biochemicznych metod enzymatycznych. Uzyskane w ten sposób wyniki nie są jednoznaczne, a na ich stabilność wpływa wiele czynników. Dlatego nie mogą być one wykorzystywane w codziennej praktyce klinicznej. Sugeruje się, że bardziej wiarygodne w tym zakresie wyniki można uzyskać za pomocą oznaczeń krążących w surowicy receptorów dla AGEs. Jednakże w niepublikowanych dotychczas wynikach badań własnych w tym zakresie nie dostarczono obiecujących rezultatów.

Ostatnio pojawiły się nowe możliwości oceny zjawiska nasilonej glikacji za pomocą oznaczeń fluorescencji kolagenu w skórze (SAF). Reaktywne, dwuwęglowe pochodne glikacji poprzez dalsze reakcje biochemiczne przekształcają się do AGEs, takich jak 5-hydro-5-metylimidazolony i fluoryzująca argpirydyna. Stanowią one mogący wykładnik gromadzonych w skórze produktów glikacji i glikooksydacji. W badaniach Monnier i wsp. [61] już wcześniej ujawnili istnienie ścisłej korelacji między zawartością AGEs w skórze a stopniem zaawansowania przewlekłych powikłań cukrzycy, zdecydowanie wyraźniejszą niż z HbA_{1c} . Z kolei Yu i wsp. [62], oceniając 54 pacjentów z cukrzycą typu 1 wyselekcjonowanych z badania DCCT, zwrócili uwagę, że u osób predysponowanych do rozwoju powikłań w stosunku do pacjentów „opornych” stopień gromadzenia w skórze produktów glikacji i glikooksydacji był zdecydowanie bardziej nasilony w pierwszej grupie. Zmiany fluorescencji skóry wykazywano nawet po spożyciu posiłków zawierających produkty glikacji, nie tylko u chorych na cukrzycę, lecz również u osób zdrowych [63]. Zwraca się również uwagę, że autofluorescencja skóry (SAF) jest zjawiskiem odwracalnym. Przyczyniać się do tego może długotrwała intensywna insulinoterapia prowadząca do normoglikemii oraz stosowanie specyficznych biologicznych cząsteczek, takich jak kwas α -liponowy, witamina A czy L-karnityna, a także wysiłek fizyczny [64–66]. Z kolei Januszewski i wsp. [67] zwrócili uwagę na istnienie ujemnej korelacji między SAF a elastycznością małych tętnic. Donoszono także o związku autofluorescencji (AF) z czasem trwania choroby. W badaniach własnych wykazano dodatnią zależność między SAF, średnią wartością HbA_{1c} i obecnością powikłań mikronaczyniowych u osób chorych na



Rycina 3. AGE-Reader (DiagnOptics Technologies B.V., Holandia)

cukrzycę typu 1 [68, 69]. Conway i wsp. [70] stwierdzili natomiast istnienie ścisłego związku SAF z obwodową i autonomiczną neuropatią.

Autofluorescencję skóry początkowo oceniano na podstawie odpowiednich barwień preparatów uzyskanych z materiału biopsyjnego. Obecnie można wykorzystać do tych celów nieinwazyjne metody oceny akumulacji AGE w skórze opierające się na jej AF wywołanej nagromadzeniem produktów glikacji. W badaniach własnych do tych celów wykorzystuje się AGE-Reader (DiagnOptics Technologies B.V., Holandia) (ryc. 3). Urządzenie to ma źródło światła promieniowania ultrafioletowego w zakresie fali 300–420 nm. Wskaźnik AF jest ilorazem średniego natężenia światła emitowanego w zakresie fali 420–600 nm do średniego natężenia światła w zakresie fali 300–420 nm.

Pierwsze badania dotyczące SAF za pomocą AGE-Reader ukazały się w pierwszej dekadzie XXI wieku. Początkowo dotyczyły one pacjentów z niewydolnością nerek lub z chorobami układu sercowo-naczyniowego. Lutgers i wsp. [71] ocenili z wykorzystaniem tej metody 973 pacjentów z badań *UK Prospective Diabetes Study* (UKPDS) i zwrócili uwagę, że SAF wiarygodnie identyfikuje osoby z cukrzycą typu 2 z wysokim ryzykiem niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych (CHD, *coronary heart disease*). Podobnie Meerwaldt i wsp. [72], obserwując przez 5 lat stosunkowo niewielkie grupy osób chorych na cukrzycę typu 1 i 2, stwierdzili, że nasilona SAF z większym prawdopodobieństwem wskazuje na ryzyko zgonu z powodu CHD niż wartość HbA_{1c} , stężenie cholesterolu frakcji LDL czy triglicerydów. W 2011 roku pojawiła się metaanaliza Bos i wsp. [73] ujawniająca pozytywny związek SAF z rozwojem nie tylko mikroangiopatii cukrzycowej (z wyjątkiem

retinopatii), lecz również makroangiopatii. Autorzy zwracają jednak uwagę, że jedynie 3 badania miały charakter prospektywny. Według nich krótki czas trwania obserwacji oraz heterogenność analizowanych grup nie upoważniają do wysunięcia jednoznacznych wniosków. Obecnie pojawiły się jednak wyniki pracy Mácsai i wsp., w której porównywali oni u chorych na cukrzycę typu 1 stopień SAF oceniany za pomocą AGE-Reader z zawartością w skórze pośrednich i końcowych produktów glikacji mierzonych metodą spektrometrii (DESI-MS, *desorption electrospray ionization mass spectrometry*). Autorzy na podstawie uzyskanych wyników wysunęli wniosek, że SAF należy uznać jako zastępczy marker ekspozycji skóry na końcowe produkty glikacji.

W podsumowaniu można więc sugerować, że łańcuch obsługi AGE-Reader i powtarzalność uzyskanych wyników zwiększą w przyszłości możliwość wykorzystywania SAF do monitorowania przebiegu cukrzycy, a SAF będzie traktowana jako biomarker wczesnych i późnych uszkodzeń tkankowych rozwijających się w przebiegu choroby.

Oświadczenie o konflikcie interesów

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

PIŚMIENNICTWO

- The relationship of glycemic exposure (HbA_{1c}) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial. *Diabetes* 1995; 44: 968–983.
- Khera P.K., Joiner C.H., Carruthers A. i wsp. Evidence for inter-individual heterogeneity in the glucose gradient across the human red blood cell membrane and its relationship to hemoglobin glycation. *Diabetes* 2008; 57: 2445–2452.
- Hinzmann R., Schlaeger C., Tran C.T. What do we need beyond hemoglobin A1c to get the complete picture of glycemia in people with diabetes? *Int. J. Med. Sci.* 2012; 9: 665–681.
- National Cancer Institute at the National Institutes of Health. Dictionary of Cancer Terms. <http://www.cancer.gov/dictionary> (dostęp: 01.2011).
- Lyons J.T., Bassu A. Biomarkers in diabetes: hemoglobin A1c, vascular and tissue markers. *Transl. Res.* 2012; 159: 303–312.
- Koenig R.J., Cerami A. Glycohemoglobins in the adult erythrocyte. *Curr. Top. Hematol.* 1979; 2: 59–73.
- The absence of a glycemic threshold for the development of long-term complications: the perspective of the Diabetes Control and Complications Trial. Absence of a glycemic threshold for the development of long-term complications: the perspective of the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes* 1996; 45: 1289–1298.
- Hirsch I.B., Brownlee M. Should minimal blood glucose variability become the gold standard of glycemic control? *J. Diabetes Compl.* 2005; 19: 178–181.
- El-Osta A., Brasacchio D., Yao D. i wsp. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression Turing subsequent normoglycemia. *J. Exp. Med.* 2008; 29: 1409–1417.
- Rosenstock J., Raskin P. Diabetes and its complications: blood glucose control vs. genetic susceptibility. *Diabetes Metab. Rev.* 1988; 5: 417–435.
- Kulkarni R.N. Identifying biomarkers of subclinical diabetes. *Diabetes* 2012; 61: 1925–1926.
- Genuth S., Sun W., Cleary P. i wsp. DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group. Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the diabetes control and complications trial and epidemiology of diabetes interventions and complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 3103–3111.
- Kerkeni M., Saidi A., Bouzidi H., Letaief A., Ben Yahia S., Hammami M. Pentosidine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 2013; 10: 239–245.
- Aroda V.R., Conway B.N., Fernandez S.J. i wsp. Cross-sectional evaluation of noninvasively detected skin intrinsic fluorescence and mean hemoglobin A1c in type 1 diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* 2013; 15: 117–123.
- Cerami A., Vlassara H., Brownlee M. Glucose and aging. *Sci. Am.* 1987; 256: 90–96.
- Wierusz-Wysocka B. Aktualne poglądy dotyczące mechanizmów patogenetycznych mikroangiopatii cukrzycowej. *Nowiny Lekarskie* 1992; 9: 68–75.
- Brownlee M. Negative consequences of glycation. *Metabolism* 2000; 49 (supl. 21): 9–13.
- Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Ann. Rev. Med.* 1995; 46: 223–234.
- Brownlee M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 1992; 15: 1835–1843.
- Lyons T.J. Glycation, carbonyl stress, EAGLEs, and the vascular complications of diabetes. *Semin. Vasc. Med.* 2002; 2: 175–189.
- Brett J., Schmidt A.M., Yan S.D. i wsp. Survey of distribution of a new characterized receptor for advanced glycation end products in tissue. *Am. J. Pathol.* 1993; 143: 1699–1712.
- Giacco F., Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* 2010; 107: 1058–1070.
- Li Poon P.B., Muphy M.P. Pathological significance of mitochondria glycation. *Int. J. Cell Biol.* 2012; doi: 10.1155/2012/843505.
- Neumann A., Schnitzel R., Palm D., Riederer P., Münch G. High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproducts induced NF-kappa B activation and cytokine expression. *FEBS Lett.* 1999; 453: 283–287.
- Basta G., Schmidt A.M., De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc. Res.* 2004; 63: 582–592.
- Pamplona R., Bellmunt J., Portero M., Riba D., Prat J. Chromatographic evidence for Amadori product formation in rat liver aminophospholipids. *Life Sci.* 1995; 57: 873–879.
- Nakagawa K., Oak J.H., Miyazawa T. Synthetically prepared Amadori-glycated phosphatidylethanolamine can trigger lipid oxidation via free radicals reactions. *FEBS Lett.* 2000; 481: 26–30.
- Bucala R., Makita Z., Koschinsky T., Cerami A., Vlassara H. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Procc. Nat. Acad. Sci.* 1993; 90: 6434–6438.
- Murta-Kamiya N., Kamiya H. Methylglyoxal, and endogenous aldehyde, crosslinks DNA polymerase and substrate DNA. *Nucl. Ac. Res.* 2001; 29: 3433–3438.
- Kasai H., Iwamoto-Tanaka N., Fukada S. DNA modifications by mutagen glyoxal: adduction to G and C, deamination of C and GC and GA cross-linking. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1459–1465.
- Chen H.J.C., Chen Y.C. Analysis of glyoxal-induced DNA cross-links by capillary liquid chromatography nanospray ionization tandem mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 2009; 22: 1334–1341.
- Berner A.K., Brouwers O., Pringle R. i wsp. Protection against methylglyoxal-derived AGEs by regulation of glyoxalase 1 prevents retinal neuroglial and vasodegenerative pathology. *Diabetologia* 2012; 55: 845–854.
- Majchrzak A., Zozulińska D., Wierusz-Wysocka B. Ocena wybranych układów antyoksydacyjnych we krwi chorych na cukrzycę. *Merkuriusz Lekarski* 2001; 57: 150–152.
- Wierusz-Wysocka B., Zozulińska D., Kempa M. i wsp. Ocena stężenia metabolitów tlenu azotu u chorych z typem 1 cukrzycy. *PAMW* 1998; 100: 139–144.
- Costagliola C. Oxidative state of glutathione in red blood cells and plasma of diabetic patients: in vivo and in vitro study. *Clin. Physiol. Biochem.* 1990; 8: 204–210.

36. Queisser M.A., Yao D., Geisler S. i wsp. Hyperglycemia impairs proteasome function by methylglyoxal. *Diabetes* 2010; 59: 670–678.
37. Ziemann S., Kass D.A. Advanced glycation end product crosslinking in the cardiovascular system: potential therapeutic target for cardiovascular disease. *Drug* 2004; 64: 459–470.
38. Murata-Kamiya N., Kamiya H. Methylglyoxal, an endogenous aldehyde, crosslinks DNA polymerase and the substrate DNA. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: 3433–3438.
39. Adaikalakoteswari A., Rema M., Mohan V., Balasubramanyam M. Oxidative DNA damage and augmentation of poly(ADP-ribose) polymerase/nuclear factor-kappa B signaling in patients with type 2 diabetes and microangiopathy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007; 39: 1673–1684.
40. Lu C., He J.C., Cai W., Liu H., Zhu L., Vlassara H. Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 11767–11772.
41. Zhang L., Zalewski A., Liu Y. i wsp. Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries. *Circulation* 2003; 108: 472–478.
42. Tan K.C., Shiu S.W., Wong Y., Tam X. Serum advanced glycation end products (AGEs) are associated with insulin resistance. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2011; 27: 488–492.
43. Diamanti-Kandarakis E., Katsikis I., Piperi C., Alexandraki K., Panidis D. Increased serum advanced glycation end products is distinct finding in lean women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Clin. Endocrinol.* 2008; 69: 634–642.
44. Boyd A.C., Abdel-Wahab Y.H., McKillop A.M. i wsp. Impaired ability of glycated insulin to regulate plasma glucose and stimulate glucose transport and metabolism in mouse abdominal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1523: 128–134.
45. Hunter S.J., Boyd A.C., O'Harte F.P. i wsp. Demonstration of glycated insulin in human diabetic plasma and decreased biological activity assessed by euglycemic-hyperinsulinemic clamp technique in humans. *Diabetes* 2003; 53: 492–498.
46. Jia X., Olson D.J., Ross A.R., Wu L. Structural and functional changes in human insulin induced by methylglyoxal. *FASEB J.* 2006; 20: 1555–1557.
47. Fiory F., Lombardi A., Miele C., Giudicelli J., Beguinot F., Van Obberghen E. Methylglyoxal impairs insulin signalling and insulin action on glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cell line INS-1E. *Diabetologia* 2011; 54: 2941–2952.
48. Oliveira L.M., Lages A., Gomes R.A. i wsp. Insulin glycation by methylglyoxal results in native-like aggregation and inhibition of fibril formation. *BMC Biochem.* 2011; 12: 41.
49. Casse A., Esposito I., Fiory F. i wsp. In skeletal muscle advanced glycation end products (AGEs) inhibit insulin action and induce the formation of multimolecular complexes including the receptor for AGEs. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 36088–36099.
50. Goglucci A. "Blinding" of AMP-dependent kinase by methylglyoxal: the mechanisms that allows perpetuation of hepatic insulin resistance? *Med. Hypotheses* 2009; 73: 921–924.
51. Unoki-Kubota H., Yamagaishi S., Takeuchi M., Bujo H., Saito Y. Pyrodoxamine, an inhibitor of glycation end product (AGE) formation ameliorates insulin resistance in obese, type 2 mice. *Protein Pept. Lett.* 2010; 17: 1177–1181.
52. Golovchenko I., Goalstone M.L., Watson P., Brownlee M., Draznin B. Hyperinsulinemia enhances transcriptional activity of nuclear factor-kappaB induced by angiotensin II, hyperglycemia and advanced glycosylation end products in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 2000; 87: 746–752.
53. Hegab Z., Gibbson S., Neyses L., Mamas M.A. Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. *World J. Cardiol.* 2010; 4: 90–102.
54. Campbell D., Somarante J., Jenkins A.J. i wsp. Diastolic dysfunction of aging is independent of myocardial structure but associated with plasma advanced glycation end-product levels. *PLOS One* 2012; 11: e49813.
55. Kilhovd B.K., Berg T.J., Birkeland K.I., Thorsby P., Hanssen K.F. Serum level of advanced glycation protein are increased in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Care* 1999; 22: 1543–1548.
56. Nin J.W., Jorsal A., Ferreira I. i wsp. Higher plasma levels of advanced glycation end products are association with incident cardiovascular disease and all-cause in type 1 diabetes: 12-year follow up. *Diabetes Care* 2011; 34: 442–447.
57. Takeuchi M., Yamagishi S. Possible involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* 2008; 14: 973–978.
58. Zhan Y., Sun H.L., Chen H. i wsp. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) protects vascular endothelial cells against advanced glycation end products (AGEs)-induced apoptosis. *Med. Sci. Monit.* 2012; 18: 286–291.
59. Li G., Tang J., Du Y., Lee C.A., Kern T.S. Beneficial effects of a novel RAGE inhibitor on early diabetic retinopathy and tactile allodynia. *Mol. Vis.* 2011; 17: 3156–3165.
60. Nagaoka T., Sato E., Takahashi A., Yokota H., Sogawa K., Yoshida A. Impaired retinal circulation in patients with type 2 diabetes mellitus: Retinal Laser Doppler Velocimetry Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; 51: 6729–6734.
61. Monnier V.M., Bautista O., Kenny D. i wsp. Skin collagen glycation, glycoxidation, and crosslinking are lower subjects with long-term intensive versus conventional therapy of type 1 diabetes: relevance of glycated collagen products versus HbA_{1c} as markers of diabetic complications. DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group. *Diabetes Control and Complications Trial.* *Diabetes* 1999; 48: 870–880.
62. Yu Y., Thorpe S.R., Jenkins A.J. i wsp. Advanced glycation end-products and methionine sulphoxide in skin collagen of patients with type 1 diabetes. DCCT/EDIC Research Group. *Diabetologia* 2006; 49: 2488–2498.
63. Stirban A., Nondrean S., Negrean M., Koschinsky T., Tschöpe D. Skin autofluorescence increases postprandially in human subjects. *Diabetes Technol. Ther.* 2008; 10: 200–205.
64. Thirunavukkarasu V., Nandhini A.T., Anuradha C.V. Fructose diet induced skin collagen abnormalities are prevented by lipolitic acid. *Exp. Diabetes Res.* 2004; 5: 237–244.
65. Verani J., Perone P., Merfert M.G., Moon S.E., Larkin D., Stevens M.J. All-trans retinoic acid improves structure and function of diabetic rat skin in organ culture. *Diabetes* 2002; 51: 3510–3516.
66. Rajasekar P., Anuradha C.V. L-carnitine inhibits protein glycation in vitro and in vivo: evidence for a role in diabetic management. *Acta Diabetol.* 2007; 44: 83–90.
67. Januszewski A.S., Sachithanandan N., Karschimkus C. i wsp. Non-invasive measures of tissue autofluorescence are increased in Type 1 diabetes complications and correlate with a non-invasive measure of vascular dysfunction. *Diabet. Med.* 2012; 29: 726–733.
68. Samborski P., Naskręć D., Araszkievicz A., Niedźwiecki P., Zozulińska-Ziółkiewicz D., Wierusz-Wysocka B. Assessment of skin autofluorescence as a marker of advanced glycation end product accumulation in type 1 diabetes. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2011; 121: 67–72.
69. Araszkievicz A., Naskręć D., Niedźwiecki P., Samborski P., Wierusz-Wysocka B., Zozulińska-Ziółkiewicz D. Increased accumulation of skin advanced glycation end products is associated with microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* 2011; 13: 837–842.
70. Conway B.N., Aroda V.R., Maynard J.D. i wsp. Skin intrinsic fluorescence correlates with autonomic and distal symmetrical polyneuropathy in individuals with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2011; 34: 1000–1005.
71. Lutgers H.L., Gerrits E.G., Graft R. i wsp. Skin autofluorescence provides additional information to the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) risk score for the estimation of cardiovascular prognosis in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2005; 52: 789–797.
72. Meerwaldt R., Lutgers H.L., Links T.P. i wsp. Skin autofluorescence is a strong predictor of cardiac mortality in diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 107–112.
73. Bos D.C., de Ranitz-Greven W.L., de Valk H.W. Advanced Glycation End Products, measured as skin autofluorescence and diabetes complications: a systematic review. *Diabetes Technol Ther.* 2011; 13(7): 773–779.
74. Mácsai E., Takáts Z., Derzbach L., Körner A., Vászárhelyi B. Verification of skin autofluorescence values by mass spectrometry in adolescents with type 1 diabetes: brief report. *Diabetes Technol. Ther.* 2013; 15: 269–272.