
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Factori predictivi ai riscului de osteoporoză la pacienții cu diabet zaharat tip 1

Doctorand **Monica Goia-Socol**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Ileana Duncea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Factorii predictivi pentru apariția osteoporozei și a fracturilor de fragilitate la pacienții cu diabet zaharat tip 1	19
1.1. Factori nemodificabili	20
1.1.1. Factori nemodificabili generali	20
1.1.1.1. Vârsta	20
1.1.1.2. Rasa	21
1.1.1.3. Sexul	21
1.1.1.4. Factorii genetici	22
1.1.1.5. Factorii constituționali	24
1.1.1.6. Antecedentele personale fiziologice	24
1.1.1.7. Antecedentele personale patologice	25
1.1.2. Factori nemodificabili în relație cu DZ tip 1	26
1.1.2.1. Vârsta la debutul bolii	26
1.1.2.2. Durata bolii	26
1.1.2.3. Necesarul de insulină	27
1.1.2.4. Complicațiile DZ tip 1	27
1.1.2.4.1. Complicațiile acute	28
1.1.2.4.2. Complicațiile cronice	29
1.2. Factori modificabili	32
1.2.1. Factori modificabili generali	32
1.2.1.1. Factori în relație cu nutriția	32
1.2.1.1.1. Mineralele	32
1.2.1.1.2. Vitaminele	34
1.2.1.1.3. Proteinele	37
1.2.1.2. Factori în relație cu stilul de viață	37
1.2.1.2.1. Activitatea fizică	37
1.2.1.2.2. Fumatul	38
1.2.1.2.3. Consumul de cafea	39
1.2.1.2.4. Consumul de alcool	39
1.2.2. Factori modificabili în relație cu DZ tip 1	40
1.2.2.1. Controlul bolii	40
2. Catepsina K în diabetul zaharat tip 1	41
2.1. Catepsina K – date generale	41

2.1. Catepsina K de origine osteoblastică	42
2.3. Catepsina K în DZ tip 1	43
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru	47
2. Metodologie comună pentru studiile 1 și 2	49
3. Studiul 1 – Factori predictivi pentru osteoporoză la pacienții cu diabet zaharat tip 1	55
3.1. Introducere	55
3.2. Ipoteza de lucru	55
3.3. Material și metodă	55
3.4. Rezultate	55
3.5. Discuții	83
3.6. Concluzii	93
4. Studiul 2 – Catepsina K la pacienții cu diabet zaharat tip 1	95
4.1. Introducere	95
4.2. Ipoteza de lucru	95
4.3. Material și metodă	95
4.4. Rezultate	95
4.5. Discuții	102
4.6. Concluzii	105
5. Metodologie comună pentru studiile 3 și 4	107
6. Studiul 3 – Efectele hiperglicemiei experimentale asupra catepsinei K secretată de osteoblaste în culturi primare de osteoblaste umane	109
6.1. Introducere	109
6.2. Ipoteza de lucru	109
6.3. Material și metodă	109
6.4. Rezultate	110
6.5. Discuții	114
6.6. Concluzii	115
7. Studiul 4 – Efectele condițiilor de diabet experimental asupra catepsinei K secretată de osteoblaste în culturi primare de osteoblaste umane	117
7.1. Introducere	117
7.2. Ipoteza de lucru	117
7.3. Material și metodă	117
7.4. Rezultate	120
7.5. Discuții	122
7.6. Concluzii	124

8. Concluzii generale	125
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	127
REFERINȚE	129

Cuvinte cheie: osteoporoză, diabet zaharat tip 1, densitate osoasă, factori predictivi, catepsina K, glucoză, insulină, diabet experimental

INTRODUCERE

Factorii predictivi pentru osteoporoză la pacienții cu DZ tip 1 reprezintă tema abordată de lucrarea de față. Această temă nu a mai fost studiată pe plan național, iar pe plan internațional se poate spune că a fost studiată insuficient, de multe ori rezultatele studiilor existente fiind contradictorii. Din insuficiența datelor pe plan internațional și lipsa lor la nivel național s-a născut ideea acestei cercetări. De asemenea, mecanismele care stau la baza apariției osteoporozei la pacienții cu diabet zaharat tip 1 nu au fost complet elucidate, mai ales cele relaționate cu resorbția osoasă. Din acest motiv, am decis extinderea ideii inițiale prin studiul celei mai importante enzime de resorbție osoasă, catepsina K, în contextul osteoporozei din diabetul zaharat tip 1, la nivel internațional neexistând nici un studiu clinic pe acest subiect.

Prima parte a tezei prezintă stadiul actual al cunoașterii referitor la factorii predictivi pentru osteoporoză studiați la nivel internațional, precum și date despre catepsina K în contextul diabetului zaharat tip 1. Punerea în practică a ideii de cercetare s-a realizat prin intermediul a patru studii descrise în detaliu la partea Contribuția personală. Obiectivele globale ale studiilor au fost evaluarea prezenței osteoporozei la un lot de pacienți tineri cu DZ tip 1 din România și evaluarea factorilor predictivi de osteoporoză la aceștia, precum și evaluarea enzimei de resorbție osoasă catepsina K în contextul diabetului zaharat tip 1 (atât clinic cât și simulat experimental).

Cercetarea efectuată cuprinde două părți majore, clinică și experimentală. Partea clinică este formată din două studii transversale caz-martor. Primul studiu a analizat comparativ diferiți parametri osoși la un lot de pacienți cu diabet zaharat tip 1 (102 subiecți) și un lot martor (59 subiecți), evaluând apoi factorii predictivi pentru osteoporoză în cadrul lotului pacienților cu diabet. Al doilea studiu a evaluat activitatea enzimatică a catepsinei K și relația acesteia cu diferiți parametri în două subploturi ale loturilor descrise anterior (78 pacienți cu diabet zaharat tip 1 și 43 martori). Partea experimentală cuprinde două studii în care a fost evaluată activitatea de formare osoasă (prin studiul activității fosfatazei alcaline) și respectiv de resorbție osoasă (prin studiul activității catepsinei K) a osteoblastelor în culturi primare de osteoblaste umane tratate cu diferite concentrații de glucoză și insulină. În primul studiu

experimental, celulele au fost tratate cu diferite concentrații de glucoză și a fost evaluată activitatea enzimelor menționate anterior. În al doilea studiu, celulele au fost tratate cu glucoză și insulină pentru a crea condiții experimentale de diabet zaharat tip 1 și au fost evaluate atât activitățile enzimatică cât și expresiile genice ale fosfatazei alcaline și catepsinei K.

Referitor la rezultatele așteptate, s-a dorit identificarea unor factori predictivi pentru osteoporoza din diabetul zaharat tip 1, care să fie utilizabili clinic pentru îndrumarea pacienților către osteodensitometrie, precum și a unor factori modificabili (protectori sau de risc pentru apariția osteoporozei) care să facă obiectul abordării de către medicul curant în cadrul consulturilor, în vederea unor recomandări adecvate legate de stilul de viață. Din partea studiilor experimentale s-a așteptat identificarea unor noi mecanisme care stau la baza osteoporozei din diabetul zaharat tip 1, care să genereze posibile recomandări clinice sau să constituie baza unor cercetări clinice ulterioare.

Importanța acestei cercetări constă în primul rând în aplicabilitatea clinică. Pe plan național este deschizătoare a unui nou drum de cercetare, iar pe plan internațional are rol atât de completare cât și inovativ. Limita cercetării este atribuibilă în principal studiului clinic care are caracter transversal, motiv pentru care sunt necesare și cercetări ulterioare cu caracter prospectiv pe această temă.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ipoteza de lucru

Obiectivele globale ale studiilor au fost evaluarea prezenței osteoporozei la un lot de pacienți tineri cu DZ tip 1 din România și evaluarea factorilor predictivi de osteoporoză la aceștia, precum și evaluarea enzimei de resorbție osoasă catepsina K în contextul DZ tip 1 (atât clinic cât și simulat experimental). Obiectivele finale ale lucrării au fost identificarea unor factori predictivi pentru osteoporoza din DZ tip 1 precum și identificarea unor noi mecanisme care stau la baza osteoporozei din diabetul zaharat tip 1.

Metodologie comună pentru studiile 1 și 2

Designul studiilor

Studiile 1 și 2 au fost de tip analitic transversal, caz-martor.

Pacienții

Au fost înrolați în studiu pacienți (femei și bărbați) cu DZ tip 1, urmăriți în Centrul de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice Cluj-Napoca, precum și martori (femei și bărbați), persoane sănătoase voluntare. Pacienții și martorii au fost comparabili din

punct de vedere al sexului, vârstei și IMC-ului. Persoanele incluse în studiu au respectat criteriile de includere și nu au prezentat criterii de excludere.

Criterii de includere

Au fost înrolați în studiu pacienți de sex feminin sau masculin diagnosticați cu DZ tip 1 cu vârste cuprinse între 20 și 55 ani și martori (persoane fără DZ tip 1) de sex feminin sau masculin cu vârste între 20 și 55 ani.

Criterii de excludere

Au fost excluși pacienții cu DZ tip 1 care prezentau nefropatie diabetică stadiul 3, 4 sau 5 ($\text{RFG} < 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$), cei care prezentau alte cauze secundare de osteoporoză (patologii endocrine, gastro-intestinale, reumatologice, medicație, etc. cunoscute ca și cauze secundare de osteoporoză anterior diagnosticate, de asemenea au fost excluse pacientele aflate la menopauză. Au fost excluși martorii care prezentau cauze secundare de osteoporoză sau orice formă de DZ și femeile aflate la menopauză.

La includerea în studiu subiecții au completat un chestionar (despre antecedentele personale fiziologice și patologice (patologia personală și medicația utilizată inclusiv istoricul personal de fracturi), antecedentele heredocolaterale de osteoporoză și fracturi, precum și informații legate de stilul de viață și nutriție), au fost efectuate măsurători antropometrice, s-a efectuat osteodensitometria DXA și s-a recoltat o probă de sânge. Din probele de sânge recoltate pacienților și martorilor au fost separate prin centrifugare serurile, din care au fost realizate multiple dozări pe linie tiroidiană, gonadică, de metabolism osos și de metabolism fosfo-calcic. Dozările au fost realizate la Clinica de Endocrinologie Cluj-Napoca. Datele pacienților cu DZ tip 1 au fost completate cu informații din fișele de la Centrul de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice Cluj-Napoca (complicațiile cronice ale diabetului, istoricul hemoglobinelor glicozilate, profilul lipidic, explorarea funcției hepatice și renale).

Studiul 1. Factorii predictivi ai apariției osteoporozei la pacienții cu diabet zaharat tip 1

Ipoteza de lucru

Scopul studiului a fost identificarea factorilor predictivi pentru osteoporoză la pacienții cu DZ tip 1.

Material și metode

Au fost înrolați în studiu 102 pacienți (45 femei și 57 bărbați) cu DZ tip 1, urmăriți în Centrul de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice Cluj-Napoca, lotul DIABET, precum și 59 martori (25 femei și 34 bărbați), persoane sănătoase voluntare, lotul MARTOR.

Rezultate

Analiza factorilor predictivi pentru osteoporoză la pacienții cu DZ tip 1

În cadrul lotului DIABET au fost analizați posibii factori predictivi pentru densitatea osoasă redusă. Pentru fiecare factor analizat, s-a calculat media, mediana sau distribuția în lotul DIABET și s-a testat asocierea cu DMO și scorul Z (prin regresii univariate și respectiv multivariate, cele din urmă cu ajustare pentru sex, vârstă și IMC) și cu parametrii dozați ai metabolismului osos (folosind regresii univariate și multivariate). Sinteza rezultatelor studiului este prezentată în tabelul de mai jos.

Tabelul 1. Sinteza rezultatelor studiului : asocierea dintre factorii predictivi și parametrii osoși.

Factorii analizați		DMO/ scor Z L1-L4	DMO/ scor Z col femural	DMO/ scor Z sold total	Osteocalcina	PTH
FACTORII NEMODIFICABILI <i>Factorii nemodificabili generali</i>						
Vârsta		-/-			0/+	+/+
Sexul	M		+ /0	+ /0	0/+	
	F			0/-		
• Factorii genetici-AHC de osteoporoză		-/0				
• Factorii constituționali: IMC		+/+	+/+	+/+	-/-	
• Factorii constituționali: raportul talie-şold					0/-	
• Factorii constituționali: variația în greutate în ultimul an					0/+	0/+
• APF: pubertatea,						
• APF: sarcina						
• APF: alăptarea						
• APP: istoricul personal de fracturi de fragilitate						
• APP: istoricul personal de fracturi traumatice			0/-	0/-		
<i>Factorii nemodificabili în relație cu DZ tip 1</i>						
• Vârsta la debutul bolii					0/-	
• Debutul diabetului					0/+	
• Durata bolii *			-/-	-/-		
• Necesarul de insuli nă	Lentă				-/-	0/+
	Rapidă					
	Lentă + rapidă				-/0	
• Complicațiile DZ tip 1 (prezența a cel puțin o complicație)					-/0	+ /0
• Afectare cardiacă				-/0	0/+	+/+

• Boală cerebrovasculară					
• Arteriopatie periferică					
• Retinopatie		-/0	-/0	-/0	0/-
• Nefropatie		-/0			+/+
• Microalbuminurie					
• Clearance creatininic			+ /0		
• Polineuropatie					
FACTORII MODIFICABILI					
<i>Factorii modificabili generali</i>					
• Calciul	Total dozat			+ /0	
	Suplimente				
• Consumul de lactate					
• Magneziul					
• Fosforul					
• Vitamina D					0/-
• Expunerea la soare					-/0
• Activitatea fizică	+ /0			+ /+	
• Fumatul	- /0			0/-	
• Consumul de cafea				- /-	0/-
• Consumul de alcool	- /-				
<i>Factorii modificabili în relație cu DZ1</i>					
• HbA1c	HbA1c-ultima valoare				0/-
	HbA1c-media pe ultimul an			- /-	-/0
	HbA1c-media pe toată durata bolii				-/0
	Diferența dintre cea mai mică și cea mai mare valoare			0/+	
+ = asociere pozitivă; - = asociere negativă; 0 sau casuță liberă = nu s-a observat asociere; • = semnificativ statistic ($p < 0.05$); • = semnificație statistică de graniță (p între 0.05 și 0.1) ; testare individuală/testare cumulativă a factorilor ; * a fost observată o diferență semnificativă în ceea ce privește DMO între durată bolii de 5-10 ani și >10 ani, DMO fiind redusă semnificativ la o durată peste 10 ani a DZ tip 1;					

Studiul 2. Catepsina K la pacienții cu diabet zaharat tip 1

Ipoteza de lucru

Scopul studiului a fost evaluarea activității enzimatice a catepsinei K la pacienții cu DZ tip 1.

Material și metodă

Din cele două loturi analizate în cadrul studiului 1 au fost delimitate două subloturi: DIABET (format din 78 de subiecți: 35 femei și 43 bărbați) și MARTOR (format din 43 de subiecți: 21 femei și 22 bărbați), la care a fost determinată activitatea catepsinei K. Alegerea persoanelor din componența subloturilor a fost realizată aleator, singurul criteriu care a fost urmărit a fost ca aceste grupuri să fie perfect comparabile din punctul de vedere al sexului, vârstei și IMC-ului.

Determinarea activității catepsinei K a fost realizată din serul persoanelor incluse în studiu, la Clinica de Endocrinologie Cluj-Napoca.

Rezultate

Sinteza rezultatelor

A fost observată o asociere negativă între DZ tip 1 și catepsina K. HbA1c peste 8% a determinat valori crescute ale catepsinei K. Între vitamina D și catepsina K a existat o asociere negativă.

Metodologie comună pentru studiile 3 și 4

Culturile primare de osteoblaste umane

Au fost obținute culturi primare de osteoblaste umane pornind de la fragmente de os trabecular de la nivelul capului femural, recoltate în timpul artroplastiei de șold de la pacienți fără boli endocrine sau metabolice. Osteoblastele subconfluente de al treilea pasaj au fost tripsinizate și transferate în plăci de cultură cu 24 de godeuri și folosite pentru experimente.

Studiul 3. Efectele hiperglicemiei experimentale asupra catepsinei K secretată de osteoblaste în culturi primare de osteoblaste umane

Ipoteza de lucru

Scopul studiului a fost evaluarea secreției osteoblastice de fosfatază alcalină (enzimă de formare osoasă) și de catepsină K (enzimă de resorbție osoasă), precum și analiza influenței diferitelor concentrații de glucoză asupra acestor două enzime în culturi primare de osteoblaste umane.

Material și metodă

Au fost folosite medii de cultură cu diferite concentrații de glucoză pentru a simula condiții diferite de glicemie: hipoglicemie, normoglicemie, hiperglicemie moderată și hiperglicemie extremă. După o expunere a celulelor timp de 36 de ore la aceste concentrații, au fost recoltate supernatantele și au fost determinate activitățile enzimactice ale catepsinei K și fosfatazei alcaline.

Rezultate

Cea mai redusă activitate a catepsinei K a fost observată la grupul hiperglicemie moderată și cea mai mare în grupul hipoglicemie. Nu a fost observată o diferență semnificativă între grupuri în ceea ce privește activitatea catepsinei K.

Au fost testate diferențele dintre fiecare grup și grupul normoglicemie. Nu au fost observate diferențe semnificative nici în ceea ce privește activitatea fosfatazei alcaline, nici a catepsinei K.

A fost testată apoi asocierea dintre concentrațiile de glucoză și activitatea fosfatazei alcaline, respectiv a catepsinei K. A fost observată o corelație slabă, invers proporțională, între glucoză și fosfataza alcalină. În ceea ce privește catepsina K, corelația a fost slabă și invers proporțională.

Prin testarea asocierii dintre fosfataza alcalină și catepsina K, a fost găsită o corelație acceptabilă, direct proporțională.

Studiul 4 – Efectele condițiilor de diabet experimental asupra catepsinei K secretată de osteoblaste în culturi primare de osteoblaste umane

Ipoteza de lucru

Scopul studiului a fost evaluarea funcției de modelare a matricei osoase a osteoblastelor, expuse, in vitro, la condiții similare diabetului, determinând expresia genei și activitatea catepsinei K în culturi primare de osteoblaste umane, menținute în medii cu diferite concentrații de glucoză și insulină, simulând stări de disglicemie întâlnite la pacienții cu DZ tip 1 (stări de disglicemie întâlnite în DZ tip 1 aflat sau nu sub tratament).

Material și metodă

Au fost create medii de cultură de tip diabet experimental. Glucoza și insulina au fost combinate cu mediul de cultură în diferite concentrații, creând patru tipuri particulare de medii de cultură simulând hipoglicemia, DZ controlat și DZ dezechilibrat, respectiv un mediu control. Celulele au fost incubate timp de 24 de ore, apoi supernatantele au fost colectate și analizate. După îndepărtarea supernatantului, celulele au fost pregătite pentru extracția ARN-ului. S-a realizat izolarea ARN și revers

transcripția. Expresiile genelor catepsinei K și fosfatazei alcaline au fost evaluate prin qPCR. Au fost determinate și activitățile enzimatică ale fosfatazei alcaline și catepsinei K din supernatante.

Rezultate

Analizând grupurile de celule, nu s-a constatat nici o diferență semnificativă între nivelul mRNA în ceea ce privește catepsina K sau fosfatază alcalină. Totuși, ca și tendință, expresia ambelor gene a fost crescută în condiții de concentrație de glucoză scăzută și redusă în condiții de hiperglicemie severă. A fost analizată asocierea dintre expresia genei catepsinei K și glucoză și, deși asocierea nu a fost semnificativă, a fost observată o relație de invers proporționalitate. În ceea ce privește asocierea dintre expresia genei catepsinei K și insulină, a fost observată o asociere pozitivă nesemnificativă. Asocierea dintre expresia genei fosfatazei alcaline și glucoză s-a dovedit a fi negativă cu semnificație la limită și pozitivă în relație cu insulina.

Diferențele între grupuri privind activitatea catepsinei K și a fosfatazei alcaline au fost determinate folosind testul ANOVA, o valoare p semnificativă statistic obținându-se în cazul catepsinei K ($p=0.016$). Pentru a aprecia diferențele valorilor catepsinei K în diferitele culturi de osteoblaste cu status disglucemic diferit, grupurile au fost luate ca perechi pentru a fi analizate. În comparație cu control, concentrația catepsinei K a fost semnificativ mai mică în supernatantul culturilor expuse la hiperglicemie moderată, fiind de asemenea redusă cu semnificație la limită în supernatantul grupului de osteoblaste expuse la hiperglicemie severă. Condițiile din culturile având o concentrație mică de glucoză nu au afectat secreția de catepsina K de către celulele osteoblastice în comparație cu grupul control; cu toate acestea, nivelul catepsinei K a fost crescut semnificativ în comparație cu mediile de cultură caracterizate de hiperglicemie moderată.

A fost testată asocierea dintre catepsina K și glucoză în supernatantul culturilor, observându-se o corelație semnificativă, invers proporțională. Nu s-a observat o asociere între catepsina K și insulină.

Un model de regresie lineară, având valoarea catepsinei K în mediul de cultură drept variabilă dependentă, respectiv glucoza și insulina ca variabile independente, nu a arătat o asociere semnificativă. A fost creat un model de regresie multiplă, în care, pe lângă glucoză și insulină luate individual, și interacțiunea dintre ele a fost introdusă ca variabilă independentă. Acest model a relevat o asociere pozitivă, semnificativă statistic, între catepsina K și insulină, respectiv între catepsina K și interacțiunea glucoză-insulină.

În rezumat, nivele scăzute de catepsină K au fost observate în culturile de osteoblaste expuse la medii având concentrații crescute de glucoză. În consens cu aceasta, o asociere invers proporțională s-a constatat între catepsina K și glucoză. O relație pozitivă a fost observată între catepsina K și insulină.

Aceleași teste au fost, de asemenea, aplicate și în cazul fosfatazei alcaline, fără a obține însă rezultate semnificative.

Concluzii generale

1. La pacienții tineri cu DZ tip 1 (femei în premenopauză și bărbați cu vârsta de maxim 55 ani) din România incluși în studiul prezent, cei mai importanți factori predictivi pentru osteoporoză, direct relaționați cu patologia, au fost durata bolii și nefropatia diabetică.

2. Durata bolii peste 10 ani determină scăderea semnificativă a DMO la nivelul șoldului, astfel pacienții cu durată a bolii peste 10 ani se recomandă a fi evaluați prin osteodensitometrie DXA

3. Prezența nefropatiei diabetice incipiente (stadiile 1 și 2) a crescut riscul de apariție a DMO reduse și a fost asociată cu o creștere semnificativă a PTH motiv pentru care pacienții cu nefropatie diabetică diagnosticată, indiferent de stadiul acesteia, se recomandă a fi evaluați osteodensitometric.

4. Vârsta a fost asociată negativ cu DMO la nivelul coloanei vertebrale lombare, iar IMC a fost asociat pozitiv cu DMO la nivelul tuturor zonelor (coloană vertebrală lombară și șold), astfel se poate specula că o vârstă apropiată de limita superioară studiată (menopauza pentru femei și 55 ani pentru bărbați) sau un IMC cu valori reduse (spre limita inferioară a normoponderalității sau sub aceasta) pot completa o indicație de efectuare DXA.

5. Pentru prevenirea apariției osteoporozei pot fi recomandate în urma rezultatelor studiului câteva măsuri aplicabile pe termen lung (preferabil toată viața) la pacienții tineri cu DZ tip 1: evitarea consumului de cafea și alcool, realizarea unei activități fizice regulate și prin colaborarea cu medicul curant, menținerea unui control metabolic optim al bolii.

6. Catepsina K a fost asociată negativ cu prezența DZ tip 1 sugerând o resorbție osoasă redusă în cadrul acestei patologii. Cu toate acestea HbA1c peste 8% determină valori crescute ale catepsinei K sugerând creșterea resorbției osoase în condițiile unui control metabolic necorespunzător.

7. Între catepsina K și vitamina D a fost observată o asociere negativă în contextul particular al loturilor studiate, fiind necesare cercetări suplimentare pentru elucidarea relației dintre cei doi parametri.

8. Expunerea osteoblastelor la glucoză, pentru o perioadă scurtă de timp (36 ore), nu influențează activitatea fosfatazei alcaline, se poate specula astfel că hiperglicemiile tranzitorii nu afectează formarea osoasă.

9. Experimental, a fost observată o relație negativă între catepsina K și glucoză și una pozitivă între catepsina K și insulină. Aceste observații pot fi importante în contextul terapiei cu insulină care prin hipoglicemia indusă, survenită în mod repetat, poate conduce la resorbția osoasă crescută.

10. Insuficiența vitaminei D observată atât la diabetici cât și la martori atrage atenția asupra unei probleme naționale, chiar mondiale și subliniază importanța expunerii solare adecvate.

SUMMARY OF THESIS

Predictive Factors for the Risk of Osteoporosis in Patients with Type 1 Diabetes

PhD **Monica Goia-Socol**

PhD supervisor **Prof. Dr. Ileana Duncea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CLUJ-NAPOCA 2014

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
LITERATURE	
1. Predictive factors for development of osteoporosis and fragility fractures in patients with type 1 diabetes	19
1.1. Unmodifiable factors	20
1.1.1. General unmodifiable factors	20
1.1.1.1. Age	20
1.1.1.2. Race	21
1.1.1.3. Sex	21
1.1.1.4. Genetic factors	22
1.1.1.5. Constitutional factors	24
1.1.1.6. Personal physiological antecedents	24
1.1.1.7. Personal pathological antecedents	25
1.1.2. Unmodifiable factors related to T1D	26
1.1.2.1. Age at onset	26
1.1.2.2. Duration of the disease	26
1.1.2.3. Insulin necessity	27
1.1.2.4. T1D complications	27
1.1.2.4.1. Acute complications	28
1.1.2.4.2. Chronic complications	29
1.2. Modifiable factors	32
1.2.1. General modifiable factors	32
1.2.1.1. Nutritional factors	32
1.2.1.1.1. Minerals	32
1.2.1.1.2. Vitamins	34
1.2.1.1.3. Proteins	37
1.2.1.2. Factors related to lifestyle	37
1.2.1.2.1. Physical activity	37
1.2.1.2.2. Smoking	38
1.2.1.2.3. Coffee	39
1.2.1.2.4. Alcohol	39
1.2.2. Modifiable factors related to T1D	40
1.2.2.1. Disease control	40
2. Cathepsin K in type 1 diabetes	41
2.1. Cathepsin K – general data	41

2.1. Osteoblastic Cathepsina K	42
2.3. Cathepsina K in T1D	43
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Hypothesis	47
2. Common methodology for study 1 and 2	49
3. Study 1 – Predictive factors for osteoporosis in patients with type 1 diabetes	55
3.1. Introduction	55
3.2. Hypothesis	55
3.3. Materials and methods	55
3.4. Results	55
3.5. Discussion	83
3.6. Conclusions	93
4. Study 2 – Cathepsin K in patients with type 1 diabetes	95
4.1. Introduction	95
4.2. Hypothesis	95
4.3. Materials and methods	95
4.4. Results	95
4.5. Discussion	102
4.6. Conclusions	105
5. Common methodology for studies 3 and 4	107
6. Study 3 - Effects of experimental hyperglycemia on cathepsin K secreted by osteoblasts in primary cultures of human osteoblastic cells	109
6.1. Introduction	109
6.2. Hypothesis	109
6.3. Materials and methods	109
6.4. Results	110
6.5. Discussion	114
6.6. Conclusions	115
7. Study 4 - Effects of experimental diabetic conditions on cathepsin K secreted by osteoblasts in primary cultures of human osteoblastic cells	117
7.1. Introduction	117
7.2. Hypothesis	117
7.3. Materials and methods	117
7.4. Results	120
7.5. Discussion	122
7.6. Conclusions	124

8. General conclusions	125
9. Originality and innovative contributions of the thesis	127
REFERENCES	129

Keywords: *osteoporosis, type 1 diabetes, bone density, predictive factors, cathepsin K, glucose, insulin, experimental diabetes*

INTRODUCTION

The predictive factors for the risk of osteoporosis in Patients with type 1 diabetes represent the topic addressed by this work. This topic has not been nationally studied and, internationally, has been insufficiently studied, often the results of the existing studies being contradictory. The idea of this research was born from insufficient international data and from the national absence of these data. Also, the mechanisms underlying the occurrence of osteoporosis in patients with type 1 diabetes have not been fully elucidated, especially those related to bone resorption. For this reason, we decided to extend the initial idea through the study of one of the most important enzymes of bone resorption, cathepsin K, in the context of osteoporosis in type 1 diabetes, internationally there being no clinical trial regarding this topic.

The first part of the thesis presents the current state of knowledge on predictive factors for osteoporosis studied internationally, and cathepsin K data in the context of type 1 diabetes. Putting the idea of research into practice was done through four studies, described in detail in the "Personal contribution" chapter. The overall objectives of the study were to evaluate the presence of osteoporosis in a group of young patients with T1DM in Romania and evaluation of predictive factors of osteoporosis in these patients, as well as evaluating bone resorption cathepsin K enzyme in the context of type 1 diabetes (both clinically and experimental simulation).

The research includes two major parts: clinical and experimental. The clinical part consists of two case-control cross-sectional studies. The first study compared different bone parameters in a group of patients with type 1 diabetes (102 subjects) and a control group (59 subjects), then evaluating predictive factors for osteoporosis in patients with diabetes. The second study evaluated the enzymatic activity of cathepsin K and its relation to different parameters in the two subgroups of the groups previously described (78 patients with type 1 and 43 controls). The experimental part, which comprises two studies, evaluated the activity of bone formation (alkaline phosphatase activity) and bone resorption (activity of cathepsin K) of osteoblasts in cultures of human primary osteoblasts treated with various concentrations of glucose and insulin. In the first experimental study, cells were treated with different concentrations of glucose and the activity of the enzymes mentioned above was

evaluated. In the second trial, cells were treated with glucose and insulin in order to create experimental conditions of type 1 diabetes, evaluating enzyme activity and gene expression of cathepsin K and alkaline phosphatase.

Regarding the expected results, we wanted to identify predictive factors for osteoporosis in type 1 diabetes that would be clinically useful for guiding patients to bone densitometry, as well as modifiable factors (protective or risk factors for development of osteoporosis) approachable by the attending physician within checkups, in order to make appropriate recommendations related to lifestyle. From experimental studies, the expectation was to identify new mechanisms underlying osteoporosis in type 1 diabetes, generating possible clinical recommendations or form the basis of subsequent clinical research.

The importance of this research lies primarily in the clinical applicability. Nationally, it leads to a new path of research, and, internationally, involves innovative components. The limitation of the research is mainly attributable to the clinical trial (transversal), which is why further prospective research is required regarding this subject.

PERSONAL CONTRIBUTION

Hypothesis

The overall objectives of the study were to evaluate the presence of osteoporosis in a group of young patients with T1DM, from Romania, and evaluation of predictive factors of osteoporosis in these patients, as well as evaluating bone resorption cathepsin K enzyme in the context of type 1 diabetes (both clinically and experimental simulation). Endpoints of the work were to identify predictive factors for osteoporosis in type 1 diabetes and the identification of new mechanisms underlying osteoporosis in type 1 diabetes.

Common Methodology for Studies 1 and 2

Studies design

Studies 1 and 2: analytical transversal case-control.

Patients

Patients with type 1 diabetes (men and women) were enrolled in the study, from the Center for Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases, Cluj-Napoca, and voluntary healthy individuals as witnesses (men and women). Patients and controls were comparable in terms of sex, age and BMI. Individuals included in the study met the inclusion criteria and had no exclusion criteria.

Inclusion criteria

Patients diagnosed with type 1 diabetes were enrolled in the study, female or male, aged between 20 and 55 years, and controls (people without T1D) female or male aged between 20 and 55 years.

Exclusion criteria

Patients with type 1 diabetes with associated diabetic nephropathy stage 3, 4 or 5 (GFR <60 ml / min / 1.73 m²), those who had other secondary causes of osteoporosis (endocrine pathology, gastrointestinal, rheumatologic, medication, etc. known as secondary causes of osteoporosis previously diagnosed) were excluded; also, postmenopausal patients, witnesses who had secondary causes of osteoporosis or any form of diabetes and menopausal women were excluded.

At baseline, subjects completed a questionnaire (personal history of physiological and pathological, personal pathology and medication use, including personal history of fractures, family history of osteoporosis and fractures, as well as information on lifestyle and nutrition), anthropometric measurements and osteodensitometry DXA were performed, and a blood sample was collected. The serum from the blood samples of patients was separated by centrifugation and multiple determinations were carried out, regarding the thyroid and gonads function, bone metabolism and phospho-calcium metabolism. Dosages were conducted at the Endocrinology Clinic Cluj-Napoca. Data of patients with type 1 diabetes were supplemented with information from records from the Center of Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases, Cluj-Napoca (chronic complications of diabetes, glycosylated hemoglobin history, lipid profile, liver function and renal exploration).

Study 1. Predictive factors of osteoporosis in patients with type 1 diabetes

Hypothesis

The aim of the study was to identify predictive factors for osteoporosis in patients with T1D.

Material and methods

102 patients (45 women and 57 men) with type 1 diabetes were enrolled in the study, from the Center of Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases, Cluj-Napoca-DIABETES group, and 59 controls (25 women and 34 men) healthy, voluntary individuals – CONTROL group.

Results

Analysis of predictive factors for osteoporosis in patients with T1D

Possible predictors for low bone density were analyzed in the DIABETES group. For each analyzed factor, the mean, median or distribution we calculated, and the

association with BMD and Z score (by univariate and, respectively, multivariate regression, the latter with adjustment for sex, age and BMI) was tested, and with bone metabolism parameters (using univariate and multivariate regressions). Summary of the survey results is presented in the table below.

Table I. Summary results of the study: the association between predictors and bone parameters.

Analyzed factors		BMD/ Z score L1-L4	BMD/ Z score Femural neck	BMD/ Z score Total hip	Osteocalcin	PTH
<u>UNMODIFIABLE FACTORS</u>						
<i>General unmodifiable factors</i>						
Age		-/-			0/+	+/+
• Sex	M		+ /0	+ /0	0/+	
	F			0/-		
• Genetic factors- family history of osteoporosis		-/0				
• Constitutional factors: BMI		+/+	+/+	+/+	-/-	
• Constitutional factors: waist hip ratio					0/-	
• Constitutional factors: weight variation in the last year					0/+	0/+
• Physiological history: puberty						
• Physiological history: pregnancy						
• Physiological history breastfeeding						
• Pathological history: personal history of fragility fracture						
• Pathological history: Personal history of traumatic fracture			0/-	0/-		
<i>Unmodifiable factors relates to T1D</i>						
• Age of onset					0/-	
• Debutul diabetului					0/+	
• Duration of the disease *			-/-	-/-		
• Insulin require ments	Basal				-/-	0/+
	Fast-acting					
	Basal+ Fast acting				-/0	
• Complications of type 1 diabetes (presence of at least one complication)					-/0	+ /0
• Heart disease				-/0	0/+	+/+

• Cerebrovascular disease					
• Peripheral arteriopathy					
• Retinopathy		-/0	-/0	-/0	0/-
• Nephropathy		-/0			+/+
• Microalbuminuria					
• Creatinine clearance			+/0		
• Polyneuropathy					
MODIFIABLE FACTORS General modifiable factors					
• Calcium	Total			+/0	
	Supplements				
• Milk products intake					
• Magnesium					
• Phosphor					
• D Vitamin					0/-
• Sun exposure					-/0
• Physical activity		+/0		+/+	
• Smoking		-/0		0/-	
• Coffee				-/-	0/-
• Alcohol		-/-			
<i>Modifiable factors relates to T1D</i>					
• A1c	A1c-last determined				0/-
	A1c-average for last year			-/-	-/0
	A1c-average for whole duration of the disease				-/0
	The difference between the lowest and highest value				0/+

+ = positive association; - = negative association; 0 or empty slot = no association was observed;
 • = statistically significant (p<0.05); • = borderline statistical significance (p între 0.05 și 0.1) ;
 individual test / cumulative test for the factors; * a significant difference in BMD between the disease duration of 5-10 years and> 10 years was observed, BMD being significantly reduced after more than 10 years of T1D:

Study 2. Cathepsin K in patients with type 1 diabetes

Hypothesis

The aim of the study was to assess the enzymatic activity of cathepsin K in patients with T1D.

Material and methods

Of the two groups analyzed in the study 1, two subgroups were delineated: DIABETES (consisting of 78 subjects: 35 women and 43 men) and CONTROL (consisting of 43 subjects: 21 women and 22 men), for which the activity of cathepsin K was determined. People were randomly assessed to subgroups, so that these groups were perfectly comparable in terms of sex, age and BMI.

Determination of cathepsin K activity was performed from the serum of individuals included in the study, at the Endocrinology Clinic Cluj-Napoca.

Results

Summary of results

There was a negative association between T1D and cathepsin K. HbA1c over 8% resulted in increased levels of cathepsin K. There was a negative association between Vitamin D and cathepsin K.

Common Methodology for studies 3 and 4

Primary cultures of human osteoblastic cells

Primary cultures were obtained from human osteoblasts, from trabecular bone fragments (femoral neck), collected during hip arthroplasty from patients without endocrine or metabolic diseases. Subconfluent osteoblasts from third passage were trypsinized and transferred to 24-well culture plates, and used for the experiments.

Study 3. Effects of experimental hyperglycemia on cathepsin K secreted by osteoblasts in primary cultures of human osteoblasts

Hypothesis

The purpose of the study was to assess the secretion of alkaline phosphatase osteoblasts (bone forming enzyme) and cathepsin K (bone resorption enzyme) and the

analysis of the influence of different concentrations of glucose on these two enzymes in primary human osteoblast cultures.

Material and methods

Culture mediums were used with different concentrations of glucose to simulate different conditions of glucose: hypoglycemia, normoglycemia, moderate and extreme hyperglycemia. After exposure of the cells for 36 hours to these concentrations, the supernatants were collected and the enzymatic activities of cathepsin K and alkaline phosphatase were determined.

Results

The lowest activity of cathepsin K was observed in moderate hyperglycemia group and the highest in the hypoglycemia group. There was no significant difference between groups in terms of the activity of cathepsin K.

Differences between each group and the normoglycemia group were tested. There were no significant differences in terms of alkaline phosphatase activity, nor cathepsin K.

The association between the glucose concentration and the activity of alkaline phosphatase and cathepsin K was also tested. A poor, inversely correlation, was observed between glucose and alkaline phosphatase. Regarding cathepsin K, the correlation was similar.

By testing the association between alkaline phosphatase and cathepsin K, an acceptable, directly proportional correlation was found.

Study 4 –The effects of diabetes experimental conditions on cathepsin K secreted by human osteoblasts in primary cultures

Hypothesis

The purpose of the study was to evaluate the bone matrix forming function of osteoblast exposed, in vitro, to similar diabetes conditions, determining the expression of the gene and the activity of cathepsin K in primary human osteoblast cultures maintained in medium with various concentrations of glucose and insulin, simulating states of dysglycemia encountered in patients with type 1 diabetes (dysglycemia states encountered in controlled or uncontrolled T1D).

Material and methods

Experimental diabetes culture mediums were created. Glucose and insulin were combined with the culture medium at various concentrations, creating four particular types of culture mediums simulating hypoglycemia, controlled diabetes and

unbalanced diabetes or control medium. The cells were incubated for 24 hours, then the supernatants were collected and analyzed. After removing the supernatant, the cells were prepared for RNA extraction. RNA isolation and reverse transcription were performed. Cathepsin K gene expression and alkaline phosphatase were evaluated by qPCR. The activities of alkaline phosphatase enzyme and cathepsin K in the supernatant were determined.

Results

Analyzing the groups of cells, there was no significant difference between mRNA levels regarding cathepsin K or alkaline phosphatase. However, as a trend, the expression of both genes was increased under conditions of low glucose concentrations and reduced under conditions of severe hyperglycemia. The association between gene expression of cathepsin K and glucose level was analyzed and, although the association was not significant, an inverse relationship came out. Regarding the association between cathepsin K and insulin gene expression a positive, insignificant association was observed. The association between gene expression of alkaline phosphatase and glucose proved to be negative and, in relation to insulin, borderline significantly positive.

Differences between the groups regarding the activity of cathepsin K and alkaline phosphatase were determined using the ANOVA test, with a statistically significant p-value for cathepsin K ($p = 0.016$). To assess differences in cathepsin K values in different cultures of osteoblasts with dysglycemia status, different groups were analysed as pairs. Compared to control, the concentration of cathepsin K was significantly lower in the supernatant of cultures exposed to moderate hyperglycemia, also being reduced, with borderline significance, in the supernatant of the osteoblasts group exposed to severe hyperglycemia. The culture conditions with a lower concentration of glucose did not affect the secretion of cathepsin K by osteoblast cells compared to the control group. However, cathepsin K was significantly increased compared with the culture medium characterized by moderate hyperglycemia.

The association between cathepsin K and glucose in the cultures supernatant was tested, observing a significant, inverse correlation. There was no association between cathepsin K and insulin.

A linear regression model, with the value of cathepsin K in the culture medium as the dependent variable, respectively, glucose and insulin as independent variables, showed no significant association. A multiple regression model was created in which, in addition to glucose and insulin individually, the interaction between them was introduced as an independent variable. This model showed a positive association, statistically significant, between cathepsin K and insulin and, respectively, between the cathepsin K and glucose-insulin interaction.

In summary, low levels of cathepsin K were observed in cultures of osteoblasts exposed to environments having high concentrations of glucose. In line with this, an inverse association was found between cathepsin K and glucose. A positive relationship was observed between cathepsin K and insulin.

The same tests were also applied in the case of alkaline phosphatase, but without achieving significant results.

General conclusions

1. In young patients with T1D (premenopausal women and men aged up to 55 years), from Romania, included in the present study, the most important predictors for osteoporosis, directly linked to the pathology, were the duration of the disease and the diabetic nephropathy.

2. The duration of the disease over 10 years causes a significant decrease in BMD, in hip, so patients with disease duration of 10 years should be further evaluated by DXA bone densitometry.

3. The presence of early diabetic nephropathy (stages 1 and 2) increased the risk of reduced BMD, and was associated with a significant increase in PTH, for this reason, in patients with diagnosed diabetic nephropathy, regardless of its stage, it is recommended bone densitometry for evaluation.

4. Age was negatively associated with BMD at the lumbar spine and BMI was positively associated with BMD at all areas (lumbar spine and hip), so it could be speculated that an age close to the upper limit in this study (menopause for women and 55 years for men) or a BMI with low values (normal weight or below) can complement an indication for performing DXA.

5. For prevention of osteoporosis, based on the study results, some long-term measures (preferably for whole life) may be recommended for young patients with type 1 diabetes: avoid coffee and alcohol consumption, regular physical activity and, in close collaboration with the doctor, achieve and maintain optimal metabolic control of the disease.

6. Cathepsin K was negatively associated with T1D suggesting the presence of low bone resorption in patients presenting this pathology. However HbA1c over 8% causes elevated cathepsin K suggesting increased bone resorption in conditions of inadequate metabolic control.

7. A negative association between cathepsin K and vitamin D was observed, in the particular context of the study groups, so further research is needed to elucidate the relationship between the two parameters.

8. Osteoblasts exposure to glucose, for a short period of time (36 hours), did not influence the activity of alkaline phosphatase, so it can be speculated that transitional hyperglycemias do not affect bone formation.

9. Experimentally, a negative relationship between cathepsin K and glucose was observed, and a positive one between cathepsin K and insulin. These observations may be important in the context of insulin therapy in which hypoglycemia, occurred repeatedly, can lead to increased bone resorption.

10. Vitamin D insufficiency, observed in both diabetic patients and controls, draws attention to a national problem, moreover, world wide spreaded, and underlines the importance of adequate sun exposure.