

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Entzündungsmarker und ihre Verbindung mit verschiedenen  
Diabetestypen und -langzeitkomplikationen bei Jugendlichen**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Juliane Aulich

aus Berlin

Datum der Promotion: 04. Juni 2021

# Inhaltsverzeichnis

1. Abstract .....	4
2. Manteltext .....	7
3. Eidesstattliche Versicherung .....	44
4. Auszug Journal List .....	47
5. Publikation .....	48
6. Lebenslauf .....	58
7. Publikationsliste .....	61
8. Danksagung .....	62

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Entzündungsreaktion durch Hyperglykämie .....	8
<b>Abbildung 2:</b> Statistisch nicht-angepasste Mediane der Level der Entzündungsmarker bei den verschiedenen Diabetestypen sowie deren Quartilsabstände. ....	21
<b>Abbildung 3:</b> Durchschnittswert und Standardfehler der Entzündungsmarker angepasst an Diabetesdauer, HbA1c-Level und BMI. ....	22
<b>Abbildung 4:</b> Statistisch nicht-angepasste Mediane der Level der Entzündungsmarker sowie deren Quartilsabstände bei Teilnehmern mit bzw. ohne Komplikationen im Vergleich.....	23
<b>FIGURE 1:</b> Unadjusted blood levels median of inflammation markers by diabetes type.....	60
<b>FIGURE 2:</b> Blood levels of inflammation markers by diabetes type. Adjusted for diabetes duration, BMI and HbA1c .....	60

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Klinische Daten der nach Diabetestyp eingeteilten Probanden. ....	19
<b>Tabelle 2:</b> Assoziation von Variablen mit Diabeteskomplikationen.....	25
<b>Tabelle 3:</b> Assoziation von Variablen mit Entzündungsmarkern .....	26
<b>Tabelle 4:</b> Level der Entzündungsmarker und Prävalenzen der Diabeteskomplikationen in verschiedenen Gewichtskategorien.....	28
<b>TABLE 1:</b> Clinical characteristics for subjects according to diabetes type.....	59
<b>TABLE 2:</b> Variables associated with diabetes complications .....	61
<b>TABLE 3:</b> Median of inflammation makers with interquartile range and prevalence of diabetes complications by weight categories .....	62

# 1. Abstract

Background: Inflammation is implicated in the pathogenesis of diabetes and its complications in adults. Little is known about the relative contribution of inflammation in common types of diabetes in youth: Type 1 diabetes (T1D), Type 2 diabetes (T2D) and cystic fibrosis-related diabetes (CFRD). This study investigates inflammatory markers by diabetes type and complication status, and assesses indicators of inflammation and complications.

Methods: A cross-sectional study of 134 T1D, 32 T2D, 32 CFRD and 48 subjects without diabetes (including 11 with CF and normal glucose tolerance) was undertaken. Inflammation was assessed by sE-selectin by ELISA, hsCRP by turbidometry, WCC and ESR. Nephropathy was defined by albuminuria, autonomic neuropathy by heart rate variability, and peripheral neuropathy by vibration and thermal threshold testing and retinopathy by seven-field stereoscopic fundus photography. Descriptive statistics, parametric and non-parametric ANOVA and regression analyses were performed, with significance at  $p < 0.05$ .

Results: Of 198 diabetic participants; 49 % female, mean (SD) age, median diabetes duration and median HbA1c were 16 (2.5) and 6 (3 – 9) years and 8.1 (6.9 – 9.3) %, respectively. All inflammatory markers were lower in T1D than in other diabetes groups ( $p < 0.05$ ) but higher than in non-diabetic controls. T2D ( $n = 32$ ) and CFRD ( $n = 32$ ) subjects had comparable elevated levels of inflammation. BMI was a strong independent explanatory variable of inflammation. In multivariate analysis, hsCRP and ESR were associated with complications in addition to HbA1c, BMI and diastolic BP.

Conclusions: Circulating inflammatory markers are elevated in adolescents with diabetes, being higher and comparable in T2D and CFRD than in T1D. Inflammation is independently associated with diabetes complications, consistent with inflammation driving vascular pathology in diabetes.

Hintergrund: Entzündliche Vorgänge spielen nachweislich eine Rolle bei der Pathogenese von Diabetes bei Erwachsenen und seinen Komplikationen. Jedoch ist wenig bekannt über das Mitwirken von entzündlichen Prozessen bei den häufigen Diabetestypen im Kindesalter: Diabetes mellitus Typ 1 (T1D), Typ 2 (T2D) und Diabetes bei Zystischer Fibrose (CFRD). In dieser Studie werden Entzündungsmarker und Komplikationsstatus bei Diabetestypen untersucht und Risikofaktoren für Entzündung und Komplikationen erforscht.

Methoden: Eine Querschnittsstudie mit 134 T1D, 32 T2D, 32 CFRD und 48 gesunden Teilnehmern (inklusive 11 Teilnehmern mit zystischer Fibrose und normaler Glukosetoleranz) wurde durchgeführt. Der Entzündungsprozess wurde anhand von in ELISA bestimmten sE-selectin, in Turbidimetrie gemessenen hsCRP sowie Leukozytenzahl und Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) ermittelt. Nephropathie wurde als Mikroalbuminurie definiert, autonome Neuropathie als pathologische Herzfrequenzvariabilität und sensomotorische Polyneuropathie wurde durch das Testen des Schwellenwerts für Vibrations- und Temperaturempfinden und Retinopathie durch 7-Feld Fundusfotographie bestimmt. Deskriptive Statistik, parametrische und nicht-parametrische ANOVA und Regressionsanalysen wurden durchgeführt und als statistisch signifikant bei einem  $p < 0,05$  gewertet.

Ergebnisse: Von 198 Teilnehmern mit Diabetes waren 49 % weiblich, das Durchschnittsalter betrug 16 Jahren (SD 2,5), die mittlere Diabetesdauer 6 Jahre (3 – 9) und der mittlere HbA1c 8,1 (6,9 – 9,3) %. Alle gemessenen Entzündungsmarker waren niedriger in T1D im Vergleich zu den anderen Diabetestypen ( $p < 0,05$ ), jedoch höher als in der gesunden Kontrollgruppe. T2D und CFRD Teilnehmer hatten ähnlich erhöhte Entzündungswerte. Der BMI konnte als unabhängig assoziierte Variable von Inflammation differenziert werden. In multivariaten Analysen zeigte sich ein Zusammenhang zwischen hsCRP und BSG mit Komplikationen sowie HbA1c, BMI und diastolischen Blutdruck.

Diskussion: Entzündungsmarker sind bei Jugendlichen mit Diabetes erhöht, insbesondere und vergleichbar hoch bei T2D und CFRD, weniger bei T1D. Inflammation ist unabhängig mit Langzeitkomplikationen durch Diabetes assoziiert und zu vereinbaren mit der vaskulären Pathogenese bei Diabetes.

## 2. Manteltext

### Forschungsstand

Als Diabetes mellitus ist eine Gruppe von Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels definiert, die durch einen absoluten oder relativen Mangel an Insulin zu Hyperglykämien führen. Die Prävalenz weltweit beträgt 7,9 bis 9,0 % und Diabetes ist somit eine der häufigsten Stoffwechselstörungen (1). Im Verlauf der Erkrankung kann es zum Auftreten von Langzeitkomplikationen mit irreversiblen Schäden an Nerven, Gefäßen, Augen und Nieren kommen, die durch chronische Hyperglykämien verursacht werden. Mit diesen einher gehen erhöhte Morbidität und Mortalität.

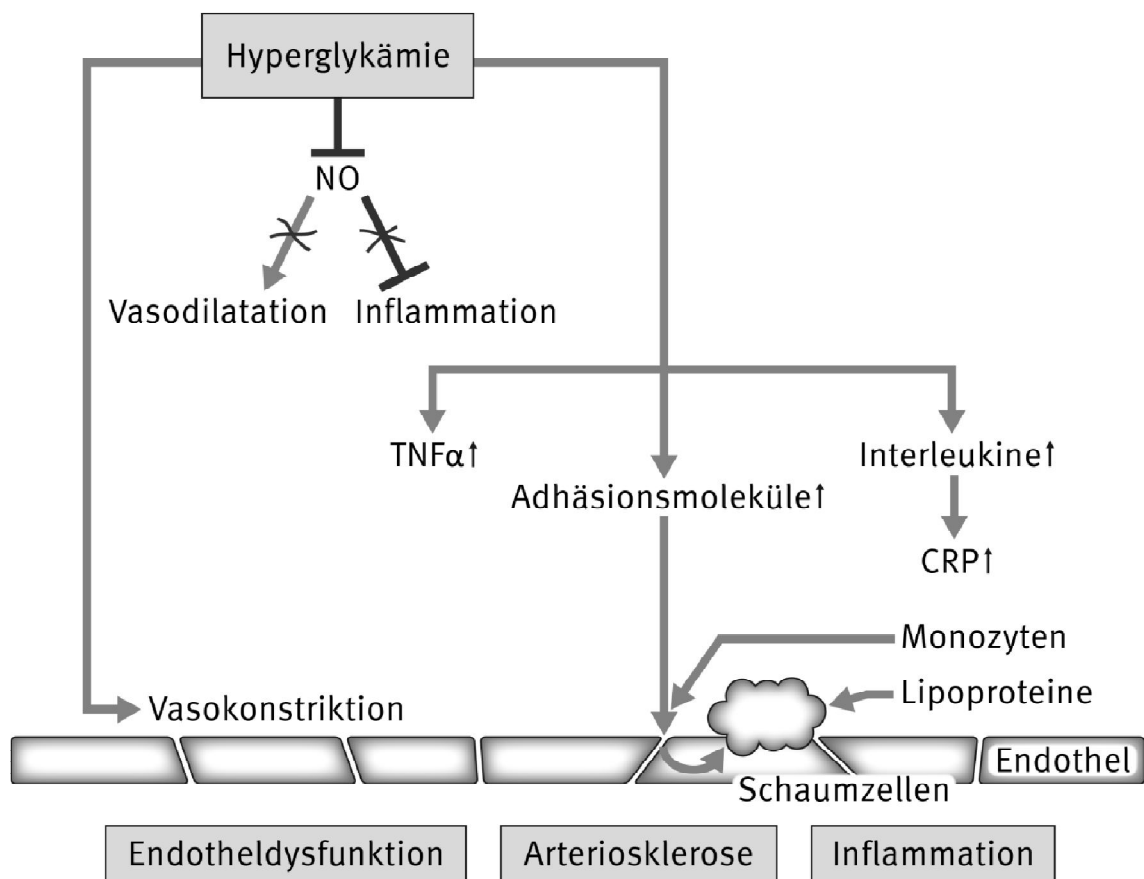
### Inflammation bei Diabetes

Schon lange ist bekannt, dass entzündliche Prozesse eine Rolle in der Pathogenese von Diabetes mellitus und denen daraus resultierenden Langzeitkomplikationen spielen. Hyperglykämie und Insulinresistenz, die die Pathologie von Diabetes charakterisieren, führen zu Schädigung von Endothel und vaskulärer Entzündung.

Hyperglykämie interveniert mit der Synthese von Stickstoff (NO), welches als wichtiger Vasodilatator und antiinflammatorisch agiert, in dem es die Synthese und Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen hemmt (2). So führt Hyperglykämie zu verstärkter vaskulärer Permeabilität und Kontraktilität sowie der Aktivierung von verschiedenen Entzündungsvermittlern wie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukinen sowie vaskulären und interzellulären Adhäsionsmolekülen wie *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) und *soluble endothelial selectin* (sE-selectin) (3, 4). Während die Interleukine wiederum die Produktion des CRP in der Leber stimulieren, locken die Adhäsionsmoleküle Monozyten zu den betroffenen Gefäßen, wo diese in das Gefäßendothel penetrieren.

Dort differenzieren sie sich durch das Binden von Lipoproteinen zu Schaumzellen und setzen einen prothrombotischen Vorgang in Gange (5). Darüber hinaus führt Insulinresistenz zu Endotheldysfunktion und entzündlichen Prozessen, da Insulin selbst NO freisetzt und physiologischerweise vasodilatatorisch wirkt (6). Somit führt eine Insulinresistenz zu Vasokonstriktion und verstärkt das Risiko für Arteriosklerose und für damit verbundene mikro- und makrovaskuläre Komplikationen.

**Abbildung 1:** Entzündungsreaktion durch Hyperglykämie



### Entzündungsmarker bei Diabetes und seinen Komplikationen

Um Entzündungsprozesse im Allgemeinen laborchemisch nachzuweisen, werden verschiedenste Entzündungsmarker standardmäßig bestimmt. Zu den systemischen Entzündungsmarkern gehören unter anderem die Leukozytenzahl (*white cell count*, WCC), Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG, *erythrocyte sedimentation rate*, ESR) und



C-reaktives Protein (CRP). Adhäsionsmoleküle als vaskuläre Entzündungsmarker (z. B. sE-selectin, VCAM-1, ICAM-1 und Interleukin-8) sind heutzutage noch der Forschung vorbehalten und zur Bestimmung sind spezielle Assays notwendig. Sie werden vom Endothelgewebe produziert und korrelieren untereinander, weil sie alle Teil der oben beschriebenen Kettenreaktion (s. Abbildung 1) sind (5).

CRP ist ein Akut-Phase-Protein und wird vor allem in der Leber, aber auch von anderen Gewebearten wie Fett und dem Gefäßsystem produziert (7) und korreliert häufig mit dem Body Mass Index (BMI) (8). Bei Entzündungsprozessen, Gefäßverletzungen oder Infektionen steigt das CRP Level an. Ein erhöhtes CRP geht mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen einher (9). Auch bei Diabetes Patienten konnte ein erhöhter CRP Spiegel festgestellt werden, jedoch bisher kein Zusammenhang mit einem vermehrten Auftreten von mikrovaskulären Langzeitkomplikationen wie Retinopathie und Nephropathie (10, 11).

sE-selectin, welches von arteriellen Endothelzellen bei erhöhtem Interleukin-1 und TNF- $\alpha$  ausgeschüttet wird und zur Adhäsion von Neutrophilen in der Gefäßwand führt, ist ein Zeichen für vaskuläre Entzündung (12). Beim Auftreten von Diabeteskomplikationen kommt es zu erhöhten Leveln von sE-selectin (13, 14).

Die BSG und Leukozytenzahl sind anerkannte, allgemeine Entzündungswerte und sind klinisch leicht zugänglich. Während die Leukozytenzahl bei Diabetes erhöht oder sogar unabhängiger Risikofaktor sein kann, existieren noch nicht viele Studien, die den Zusammenhang von BSG und Diabetes untersuchen (15-17).

Langzeitkomplikationen wie diabetische Neuropathie, Nephropathie, Retinopathie und Atherosklerosis durch Diabetes führen zu Morbidität und Mortalität. Ihre Prävention nimmt einen großen Stellenwert in der Therapie von Diabetes ein. Ein Zusammenhang zwischen einer Erhöhung von Entzündungsmarkern und dem Auftreten von Diabetesfolgen konnte bereits gezeigt werden (18-20). Deshalb gibt es Bestrebungen,

verschiedenste Entzündungsmarker als prädiktive Biomarker zu etablieren, um frühzeitig in den Krankheitsverlauf zu intervenieren.

Außerdem gilt es, neben der Erforschung einer Vielzahl verschiedener Entzündungsvermittlern auch, unterschiedliche Cofaktoren des Entzündungsprozesses zu ermitteln. Einer dieser ist Übergewicht. So konnten Beziehungen zwischen TNF- $\alpha$ , der von Adipozyten sezerniert wird, und einer zunehmenden Insulinresistenz aufgezeigt werden (21). Bei T1D zeigte sich Übergewicht auch als Risikofaktor für diabetische Langzeitkomplikationen (22, 23).

### Der Vergleich verschiedener Diabetestypen

Unter dem Krankheitsbild Diabetes sind verschiedene Diabetestypen zusammengefasst, die häufigsten sind Typ 1 und Typ 2, welche beide durch chronische Hyperglykämien definiert sind und deshalb Parallelen in der Pathogenese haben, jedoch auch viele Unterschiede.

Bei T1D handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, bei der die  $\beta$ - Zellen des Pankreas zerstört werden und so ein absoluter Insulinmangel entsteht. Patienten sind ein Leben lang auf externe Insulinzufuhr angewiesen. Meistens manifestiert sich die Erkrankung im Kinder- oder Jugendalter und verläuft akut mit Hyperglykämie und Glukosurie bis hin zum hyperglykämischen Koma mit Ketoazidose.

An T2D leiden 90 – 95 % der Diabetiker. Eine jahrelange Überproduktion von Insulin führt sowohl zu einer Insulinresistenz der Körperzellen als auch zu einem Insulinmangel durch Apoptose der  $\beta$ -Zellen sowie einem sekretorischen Defekt der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Der Verlauf ist meistens schleichend. Risikofaktoren für T2D sind z.B. eine positive Familienanamnese, Zugehörigkeit zu einer Ethnie mit erhöhtem Risiko, Adipositas, körperliche Inaktivität und Rauchen (24). Während T2D vor wenigen Jahrzehnten noch als „Altersdiabetes“ galt, erkranken heutzutage immer mehr

Jugendliche an T2D. Neben verschiedenen medikamentösen Ansätzen mit oralen Antidiabetika stehen eine Veränderung der Ernährung und mehr körperliche Aktivität mit Ziel der Gewichtsreduktion an erster Stelle der Therapie. Insbesondere bei T2D ist der Zusammenhang zwischen erhöhten Leveln von Entzündungsmarkern und -vermittlern wie CRP, Interleukin-6 und Leukozyten und der Entstehung von Insulinresistenz seit langem bekannt (16, 18, 25).

Gemein ist beiden Diabetestypen die Entwicklung von mikro- und makrovaskulären Langzeitkomplikationen im Verlauf der Erkrankung. Zeitpunkt des Auftretens und Schwere der Komplikation hängen von Faktoren wie Hämoglobin A1c (HbA1c)-Level, Länge der Diabeteserkrankung, Gewicht und Rauchen ab (26-28). Insgesamt kommt es bei T2D früher im Krankheitsverlauf und häufiger zum Auftreten von Komplikationen (29-31).

Beide Diabetesformen sind seit Jahrzehnten bekannt und werden seitdem ausgiebig erforscht. Diabetes bei zystischer Fibrose (*cystic fibrosis*, CF) stellt hingegen eine kleine Randgruppe bei den Diabetestypen dar. Seit jedoch durch verbesserte Behandlungsoptionen von pulmonalen Infektionen die Lebenserwartung von Patienten mit CF in den letzten Jahrzehnten drastisch gestiegen ist und mit den neuen Therapieoptionen der CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*)-Modulatoren wohl weiter steigen wird, rücken Langzeitkomplikationen der CF wie Diabetes bei CF (*cystic fibrosis related diabetes*, CFRD) mehr in den Fokus (32). Rund 40 % der Erwachsenen und 25 % der Jugendlichen mit CF erkranken an CFRD (33). CF im Allgemeinen ist mit einem systemischen sowie insbesondere einem pulmonalen Entzündungsprozess verbunden, Übergewicht spielt eine untergeordnete Rolle. Bisher ist die genaue Pathogenese des CFRD ungeklärt, jedoch wird als eine primäre Ursache ein relativer Insulinmangel aufgrund von zerstörtem endokrinen Pankreasgewebes angenommen (33). In akuten pulmonalen Exazerbationen bedingt durch einen höheren

Spiegel an Kortisol, Katecholaminen und Zytokinen scheint auch eine gewisse Insulinresistenz eine Rolle zu spielen (34). Der CFRD besteht aus einem breiten Spektrum verschiedener Glukosetoleranzstörungen: in frühen, oft asymptomatischen Phasen zeigt sich nur eine gestörte Glukosetoleranz ohne erhöhte Nüchternblutglukose, manchmal kommt es erst Jahre später zu erhöhten Nüchternblutzuckerwerten. Ein oraler Glukosetoleranztest kann frühzeitig Aufschluss über eine gestörte Glukosetoleranz geben. Eine frühzeitig eingeleitete Insulintherapie kann das mit CFRD verbundene schlechtere Outcome der CF wie eine erhöhte Mortalität und eine verschlechterte Lungenfunktion positiv beeinflussen (35). Immer mehr spielen auch mikrovaskuläre Veränderungen als Form von Diabeteslangzeitkomplikationen für CF Patienten eine Rolle, diese sind jedoch bis heute –insbesondere bei jungen Patienten – nur wenig erforscht (36). Bisher ist noch nicht viel über diabetische Langzeitkomplikationen bei CFRD bekannt, insbesondere bei einer so kurzen Diabetesdauer wie in unserem Falle. Noch vor wenigen Jahren war die Lebenserwartung der Patienten mit CF deutlich verkürzt und CFRD Patienten erreichten oft nicht ein Alter, in dem sie Langzeitkomplikationen durch Diabetes entwickelt hätten. Mit der ansteigenden Lebenserwartung, von aktuell 45 Jahren (32), werden diese Diabetesform, die entstehenden Komplikationen und die Erkennung sowie Kontrolle von Risikofaktoren zunehmend wichtiger. Nach heutigem Kenntnisstand ist die Verbindung zwischen den pathologischen Veränderungen des Glukosestoffwechsels und der Mutation des *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) Proteins noch nicht komplett verstanden und die Faktoren, die bei der Entstehung der chronischen Komplikationen von CFRD eine Rolle spielen, sind noch unklarer. Jedoch scheint ein Entzündungsprozess Teil der Pathologie zu sein. Es wird angenommen, dass bei CF eine Obstruktion der Pankreasgänge zu einer exokrinen und endokrinen Pankreasdysfunktion führen kann (37). Außerdem kommt es im Respirationstrakt zu

Obstruktionen mit Zerstörung von Epithel und der Proliferation von Bakterien (38). Somit ist CF im Allgemeinen eine Erkrankung, die durch eine chronische, systemische und pulmonale Entzündung, auch in Abwesenheit von Keimen, gekennzeichnet ist (39, 40). Mit Diabetes als Komorbidität, die 50 % der CF Patienten im Alter von 30 Jahren betrifft (41), wird auch die vaskuläre Entzündung ein Thema dieser komplexen Erkrankung. In unserer Studie sahen wir ähnlich hohe systemische und vaskuläre Entzündungsmarker bei CFRD wie bei T2D und höhere Prävalenzen für HVV und Retinopathie als vorangegangene Studien, was darauf hindeuten könnte, dass das Risiko für Langzeitkomplikationen auch bei CFRD alarmierend hoch ist im Vergleich zu T1D und bisher unterschätzt wurde (36, 42).

#### Entzündung bei Jugendlichen mit Diabetes

Während bereits einige Studien über den Zusammenhang von Entzündungsprozessen bei Erwachsenen mit Diabetes vorliegen, ist die Datenlage bei jugendlichen Patienten noch unzureichend (18). Doch gerade im jungen Alter gilt es Risikofaktoren und Prädiktoren zu eruieren, um die langfristige Krankheitsentwicklung des Diabetes positiv zu beeinflussen. Deshalb untersuchten wir in unserer Querschnittsstudie, Zusammenhänge zwischen Entzündungsmarkern, Langzeitkomplikationen des Diabetes und den Einfluss von Übergewicht in den drei häufigen Diabetesformen im jugendlichen Alter, T1D, T2D und CFRD.

## **Methodik**

Bei unserer Studie handelte es sich um eine Querschnittsstudie, in der vier verschiedene Entzündungsbiomarker, hsCRP (hochsensitives CRP), sE-selectin (*soluble endothelial selectin*), Leukozytenzahl und BSG, in den Blutproben von jungen Patienten mit Diabetes gemessen wurden. In den Kontrollgruppen ohne Diabetes wurden zwei verschiedene Biomarker, hsCRP und sE-selectin, bestimmt, der Vergleich zu Leukozytenzahl und BSG wurde zu Standardreferenzwerten des Krankenhauses gezogen.

Alle Teilnehmer mit Diabetes wurden am Tag der Blutentnahme ebenfalls auf das Vorkommen von Langzeitkomplikationen durch Diabetes untersucht. Im gewonnenen Blut wurden die Biomarker sowie andere Standardlaborwerte bestimmt.

Die Studie wurde am Children's Hospital Westmead (CHW), Sydney, New South Wales, Australien geplant und durchgeführt. Eine Ethik-Kommission des Krankenhauses hat die Studie geprüft und bewilligt. Die Teilnehmer und ihre Eltern wurden schriftlich aufgeklärt und haben in die Teilnahme eingewilligt.

## ***Teilnehmer***

An der Studie nahmen 198 junge Patienten mit Diabetes teil, die zwischen 2011 bis 2017 das CHW besuchten. Davon waren 134 Jugendliche aufgrund der Klinik oder niedrigen C-Peptid Leveln und Autoantikörpern als T1D diagnostiziert, 32 bei negativem Autoantikörperstatus und ohne MODY oder sekundärem Diabetes als T2D, sowie 32 weitere mit CFRD.

CFRD ist definiert als ein Nüchternblutzuckerwert von  $>7\text{mmol/l}$ / $>126\text{mg/dl}$  oder ein 2-Stunden-Blutglukoselevel von  $>11,1\text{ mmol/l}$ / $>200\text{ mg/dl}$  bzw. ein Hämoglobin A1c (HbA1c)  $>6,5\%$  bei Patienten mit CF.

Die Rekrutierung der Teilnehmer fand während ihres alljährlichen Besuchs in der Langzeitkomplikations-Diabetessprechstunde statt. In Australien wird dieser allen Jugendlichen mit T1D empfohlen, wenn sie bereits 2 Jahre an Diabetes leiden oder erst 5 Jahre nach Diagnose, wenn sie zum Zeitpunkt der Diagnose noch nicht 11 Jahre alt waren. Patienten mit T2D und CFRD sollten bereits erstmalig bei Diagnose des Diabetes vorstellig werden, weil ein bereits bei Diagnose vermehrtes Vorkommen von Langzeitkomplikationen darauf hindeute, dass bei T2D und CF ein bestehender Diabetes über längere Zeit unentdeckt bleibt.

Auswahlkriterien für die Studie waren ein aktuell stabiler Krankheitsverlauf, keine schweren Hypoglykämien in den letzten 6 Monaten, keine Hinweise auf eine akute Infektion und keine orale Steroidtherapie in den letzten 4 Wochen. Keiner der teilnehmenden Patienten mit CF wurde mit CFTR-Modulatoren behandelt.

Zwei alters- und geschlechtsangepasste Referenzgruppen bestehend aus 37 gesunden Jugendlichen und 11 CF-Patienten mit normaler Glukosetoleranz wurden ebenfalls zwischen 2011 und 2017 rekrutiert. Die gesunden Teilnehmer durften nicht an einer chronisch-inflammatorischen Erkrankung, rezidivierenden Fieberschüben oder einer anderen Infektionserkrankung leiden. Sie konnten erstgradige Verwandte von T1D-Patienten sein, so lange bei ihnen keine Diabetesantikörper nachgewiesen wurden. CF-Patienten konnten teilnehmen, wenn sie keine Anzeichen für eine akute Exazerbation zeigten und seit mindestens 4 Wochen keine oralen Steroide eingenommen hatten.

### ***Klinische Daten und Erfassung von Langzeitkomplikationen bei Diabetikern***

Von jedem Teilnehmer der Studie wurden klinische Daten wie Größe, Gewicht und Blutdruck (BD) erhoben sowie 10 ml venöses Blut und eine Morgenurinprobe abgenommen. Für die klinischen Daten wurden alters- und geschlechtsspezifische *standard deviation scores* (SDS) und Perzentilen berechnet. Mit dem berechneten

Body-Mass-Index (BMI, Gewicht/Größe<sup>2</sup>) wurden Gewichtskategorien nach S2-Leitlinien eingeteilt: Untergewicht <15. Perzentile, Normalgewicht  $\geq$ 15. Perzentile und  $\leq$ 85. Perzentile, Übergewicht >85. Perzentile und <97. Perzentile, Adipositas  $\geq$ 97. Perzentile (43). Der Blutdruck wurde nach Riva-Rocci nach fünfminütiger Ruhe in sitzender Position erhoben. Als Bluthochdruck wurden Blutdruckwerte  $\geq$ 95. Perzentile für Patienten jünger als 18 Jahre bzw. für ältere Teilnehmer Werte  $\geq$ 140/90 mmHg oder jegliche medikamentöse antihypertensive Therapie gegen Bluthochdruck gewertet (44).

**Laboruntersuchungen.** Die Blutproben wurden zentrifugiert und das Blutplasma wurde zunächst bei -80 °C gelagert. Im Zentrallabor des CHW wurden im Blut HbA1c, Leukozytenzahl, BSG, Blutfettwerte sowie Leber- und Nierenwerte bestimmt, der Urin wurde auf Albumingehalt untersucht. HbA1c wurde per Hochleistungsflüssigkeitschromatographie bestimmt und der Albumin-Kreatinin-Quotient im Urin wurde durch eine Immunturbidimetrie erfasst. Die Normwerte entsprachen den australischen Guidelines (45). Am National Health and Medical Research Centre (NHMRC) der Universität Sydney wurde zur Bestimmung von hsCRP eine hochsensitive Turbidimetrie und zur Bestimmung von sE-selectin ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Dabei betrug die Intra-Assay-Varianz weniger als 5 % und die Inter-Assay-Varianz weniger als 13 %.

Von *diabetischer Nephropathie* wurde im Rahmen dieser Studie bei einer Mikroalbuminurie gesprochen. Diese war definiert als entweder ein Albumin-Kreatinin-Quotient  $\geq$ 20  $\mu$ g/min in mindestens 2 von 3 Morgenurinproben oder ein Durchschnitts-Albumin-Kreatinin-Quotient  $\geq$ 3,5 (männlich)/ $\geq$ 4 (weiblich) mg/mmol in 3 Morgenurinproben.



**Herzfrequenzvariabilität**, eine Variable zum Beschreiben der autonomen Veränderung der Frequenz des Herzrhythmus, wurde anhand eines 10-minütigen EKGs mithilfe von LabChart Pro (AD Instruments, Sydney, NSW, Australien) analysiert. Zunächst wurden Artefakte und Extrasystolen exkludiert. Anschließend wurde die Herzfrequenzvariabilität in den Bereichen Zeit und Frequenz beurteilt. Bezüglich der Zeitdomäne werden die Grundherzfrequenz, die Standardabweichung von RR-Intervallen und die Quadratwurzel des quadrierten Mittelwertes der Summe aller Differenzen aufeinanderfolgender RR-Intervalle analysiert. Weiterhin werden die Frequenzanteile, die dem Sympathikus (Niedrigfrequenz, *low frequency*, zwischen  $>0,04$  Hz und  $<0,15$  Hz) oder dem Parasympathikus (Hochfrequenz, *high frequency*, zwischen  $>0,15$  Hz und  $<0,4$  Hz) zugeordnet werden können, sowie der Quotient aus Niedrigfrequenz und Hochfrequenz als Kennwert für sympathovagale Balance analysiert. Herzfrequenzvariabilitätsveränderungen (HVV) wurden definiert als Werte  $\leq 5$ . oder  $\geq 95$ . Perzentile einer alters- und geschlechtsgleichen Kontrollgruppe in mindestens einer von den verschiedenen Kategorien.

**Diabetische sensomotorische Polyneuropathie** wurde durch die Beurteilung der Temperatur- und Vibrationssensibilität des Fußes eingeschätzt. Der Vibrationsschwellenwert wurde am linken Malleolus und der linken großen Zehe und der thermische Schwellenwert für Kalt und Warm auf dem linken Fußrücken bestimmt. Die Normwerte wurden in einer alters- und geschlechtsgleichen Kontrollgruppe ohne Diabetes ermittelt, Messungen  $\geq 95$ . Perzentile in einem dieser 4 Tests wurde als sensomotorische Polyneuropathie gewertet.

**Diabetische Retinopathie** wurde mithilfe einer 7-Feld-Fundus-Farbfotografie durch einen erfahrenen Ophthalmologen diagnostiziert und in Schweregrade nach der *Airlie*

*House* Klassifikation eingeteilt. Bei mindestens einem Mikroaneurysma oder einer retinalen Blutung wurde die Diagnose diabetische Retinopathie gestellt. Der Schweregrad der Retinopathie bezog sich jeweils auf das schwerer betroffene Auge und wurde in folgende Kategorien eingeteilt: minimale, nicht-proliferative Veränderungen, mittelschwere, nicht-proliferative Veränderungen oder proliferative Veränderungen.

**Statistik.** Die Daten wurden mit *SPSS Version 24* analysiert. Statistische Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt. Bei einer Normalverteilung der Variabel wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet. In deskriptiven Analysen wurden der Durchschnittswert  $\pm$  Standardabweichung (*standard deviation*, SD) oder der Median und der Quartilsabstand für kontinuierliche Variablen sowie Anzahl und Prozentsatz für kategoriale Variablen errechnet. Zum Vergleich von Gruppen wurde der ANOVA-Test (mit Bonferroni-post-hoc-Test) für Variablen mit Normalverteilung genutzt und Kruskal-Wallis ANOVA (mit Mann-Whitney-Test) für nicht normalverteilte Variablen. Für kategoriale Variablen wurde der chi-square-Test verwendet. Mithilfe von univariaten und multivariaten logistischer Regression wurden die Verbindungen zwischen Auftreten von Langzeitkomplikationen und laborchemischen Ergebnissen ergründet. Mikrovaskuläre Komplikationen wurden definiert als das Vorkommen von entweder Mikroalbuminurie, sensomotorischer Polyneuropathie oder diabetischer Retinopathie. Statistisch signifikante sowie klinisch wichtige Variablen wurden in die Regressionsmodelle involviert. Untersuchte Kovariaten waren HbA1c, Krankheitsdauer und BMI, deren Einfluss auf die Entwicklung von Langzeitkomplikationen schon oft gezeigt wurde.

## Ergebnisse

### *Klinische Ergebnisse*

Die wichtigsten demographischen Daten der 198 Studienteilnehmer sind in Tabelle 1 abgebildet. Das Durchschnittsalter betrug 15,6 Jahre (SD 2,5) und 49 % waren weiblich. Die Jugendlichen mit T1D waren ein wenig älter, waren jünger bei ihrer Diagnose, hatten eine längere Krankheitsdauer und höhere HbA<sub>1c</sub>-Spiegel. Die Teilnehmer mit T2D hatten höhere BMIs, mehr Bluthochdruck und vermehrt pathologische Lipidwerte als die mit T1D. Im Vergleich zu T1D hatten die Patienten mit CFRD einen geringeren BMI, niedrigere HbA<sub>1c</sub>-Level und erhöhte Leberenzyme.

**Tabelle 1:** Klinische Daten der nach Diabetestyp eingeteilten Probanden.

	<b>T1D</b> (n=134)	<b>T2D</b> (n=32)	<b>CFRD</b> (n=32)
<b>Alter</b> (in Jahren)	15,8 [2,6]	15,1 [1,9]	14,6 [2,2]
<b>Alter bei Diagnose</b> (in Jahren)	7,5 [3,3]	13,0 [1,6]	12,0 [2,6]
<b>Diabetesdauer</b> (in Jahren)	8,1 [5,4–10,5]	1,8 [0,3–3,3]	2,3 [1,0–3,9]
BMI	22,7 [20,7–25,9]	31,7 [27,5–35,2]	18,5 [16,7–20,6]
HbA <sub>1c</sub> (%)	8,5 [7,7–9,5]	6,6 [5,6–9,2]	5,9 [5,7–6,5]
Bluthochdruck	12/134 [9 %]	6/31 [19 %]	0/28 [0 %]
Erhöhte Leberenzyme*	14/96 [15 %]	7/26 [27 %]	9/19 [47 %]
Pathologische Lipidwerte**	19/134 [14 %]	15/31 [48 %]	7/29 [24 %]
<i>Langzeitkomplikationen durch Diabetes</i>			
<b>Auftreten mind. einer Kompl.</b>	87/134 [65 %]	23/31 [72 %]	18/28 [56 %]
<b>Diabetische Nephropathie</b>	1/123 [1 %]	6/20 [19 %]	0/19 [0 %]
<b>HVV</b>	35/126 [28 %]	14/26 [54 %]	12/24 [50 %]

<b>Sensomotorische Polyneuropathie</b>	6/132 [5 %]	6/31 [19 %]	0/27 [0 %]
<b>Diabetische Retinopathie</b>	21/133 [16 %]	2/30 [7 %]	2/26 [8 %]

X[X-X] steht für Median [25. Perzentile – 75. Perzentile], X[X] für Durchschnittswert [SD]

\* (erhöhte AST, ALT, Gamma-GT oder alkalische Phosphatase), \*\* (erhöhtes Gesamtcholesterol, LDL Cholesterol, Triglyceride oder erniedrigtes HDL Cholesterol)

### ***Entzündungsmarker***

In Abbildung 2 wurden die Level der Entzündungsmarker in den drei verschiedenen Diabetesgruppen dargestellt. Die gesunde Kontrollgruppe (gestrichelte, horizontale Linie in Abb. 2) hatte einen Median hsCRP von 0,4 (0,2 – 0,8) mg/L und einen Median sE-selectin von 38,9 (27,4 – 60,4) ng/ml, die CF-Patienten (gepunktete, horizontale Linie in Abb. 2) einen Median hsCRP von 1,0 (0,1 – 1,6) mg/L und einen Median sE-selectin von 58,0 (42,9 – 78,6) ng/ml. Bei den T2D- sowie CFRD-Patienten waren hsCRP und sE-selectin signifikant erhöht im Vergleich zu den Referenzgruppen: 2,3 (1,0 – 4,5) mg/L ( $p < 0,001$ ) und 62,6 (46,4 – 80,7) ng/ml ( $p = 0,005$ ) und 1,6 (0,5 – 5,0) mg/L ( $p = 0,003$ ) und 71,5 (48,5 – 115,8) ng/mL ( $p = 0,002$ ). Zwischen T1D und den gesunden Teilnehmern konnte nur ein numerischer Trend nachgewiesen werden (0,5 (0,3 – 1,4) mg/L ( $p = 0,09$ ) und 42,1 (33,1 – 55,0) ng/ml ( $p = 0,68$ )).

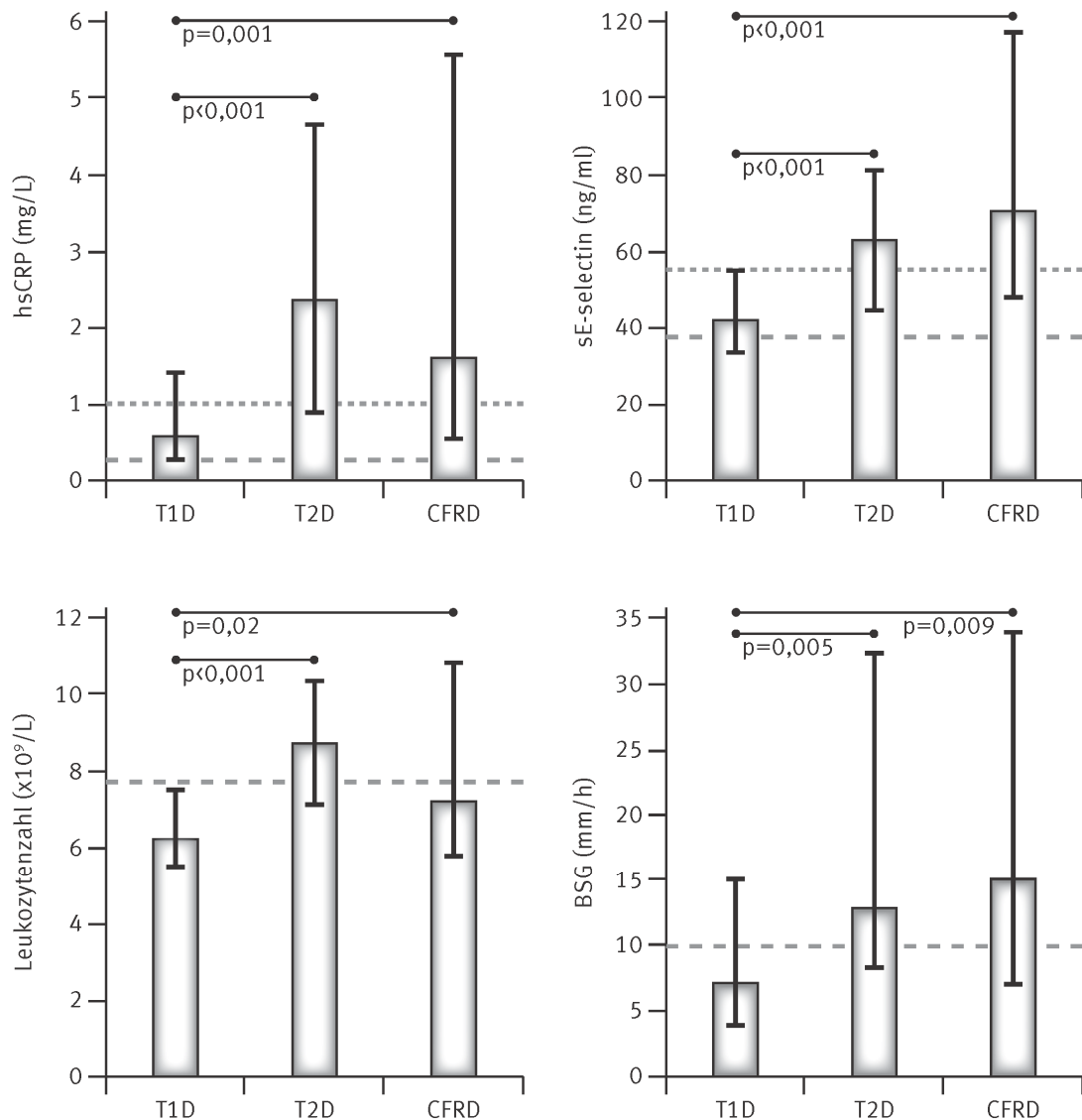
Sowohl der Median der Leukozytenzahl als auch die BSG der T1D Teilnehmer (6,3 (5,4 – 7,6)  $\times 10^9/L$  und 7,0 (4,0 – 15,0) mm/h) und der T2D Teilnehmer (8,8 (7,2 – 10,2)  $\times 10^9/L$  und 13,0 (9,0 – 30,0) mm/h) befanden sich innerhalb des Normbereiches (Leukozytenzahl für 5 – 10-jährige 5,0 – 14,5  $\times 10^9/L$ , für 10 – 15-jährige 4,5 – 13,5  $\times 10^9/L$ , für >15-jährige 4,0 – 11,5  $\times 10^9/L$ , BSG 0 – 20 mm/h, für Jungen >15 Jahre 0 – 15 mm/h).

Aus Abbildung 2 geht hervor, dass im Vergleich zu der T1D-Gruppe alle Entzündungsmarker bei T2D (hsCRP  $p < 0,001$ , sE-selectin  $p < 0,001$ , WCC  $p < 0,001$ ,

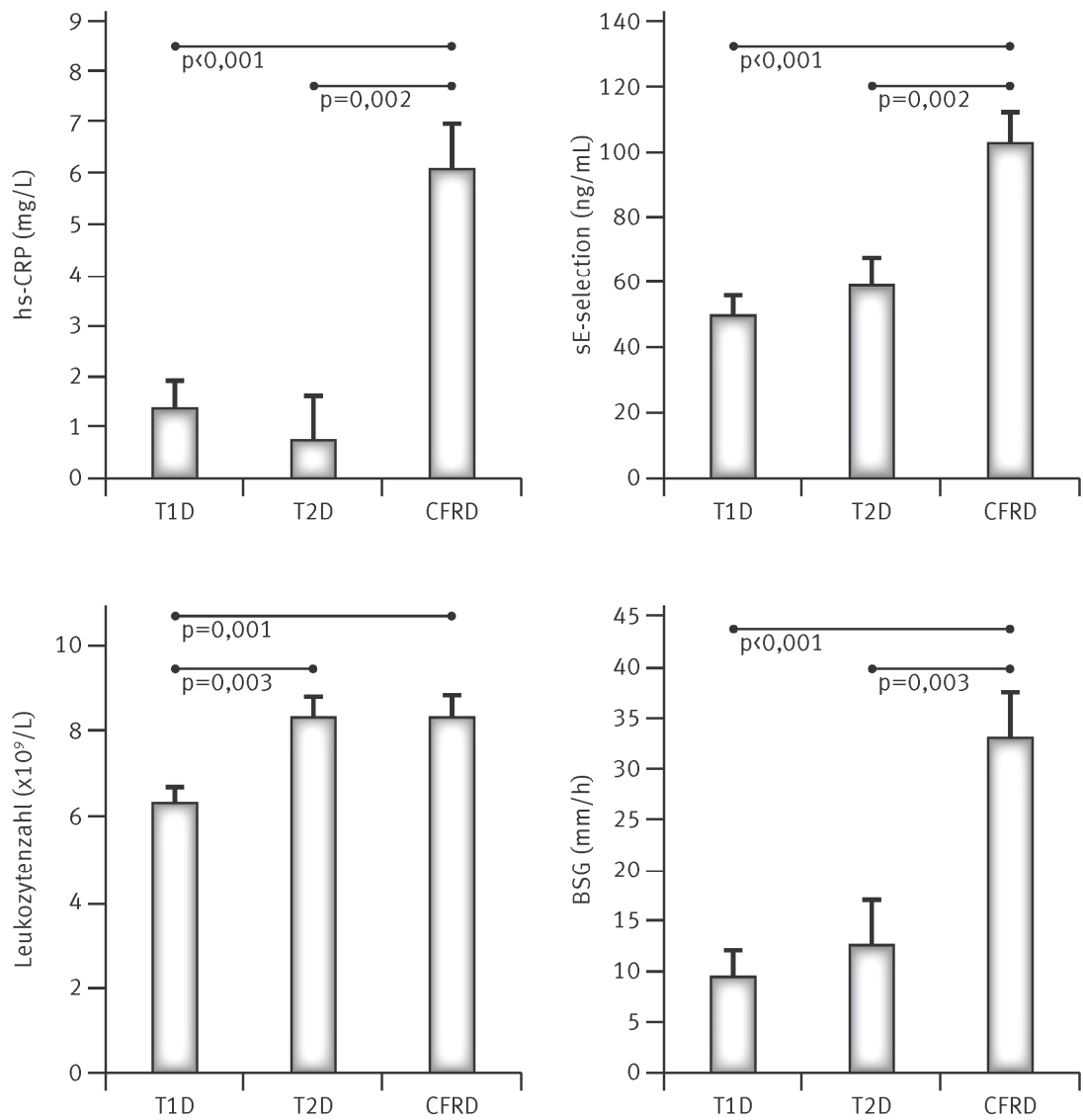
ESR  $p = 0,005$ ) sowie CFRD (hsCRP  $p = 0,001$ , sE-selectin  $p < 0,001$ , WCC  $p = 0,02$ , ESR  $p = 0,01$ ) signifikant erhöht waren.

Nach statistischer Anpassung für BMI, Diabetesdauer und HbA1c waren die Entzündungsmarker bei CFRD im Vergleich zu T1D immer noch signifikant erhöht (Abb. 3). Außerdem konnte nach statistischer Anpassung auch eine signifikante Erhöhung der Marker bei CFRD im Vergleich zu T2D festgestellt werden (hsCRP  $p = 0,002$ , sE-selectin  $p = 0,002$ , ESR  $p = 0,003$ ).

**Abbildung 2:** Statistisch nicht-angepasste Mediane der Level der Entzündungsmarker bei den verschiedenen Diabetestypen sowie deren Quartilsabstände.

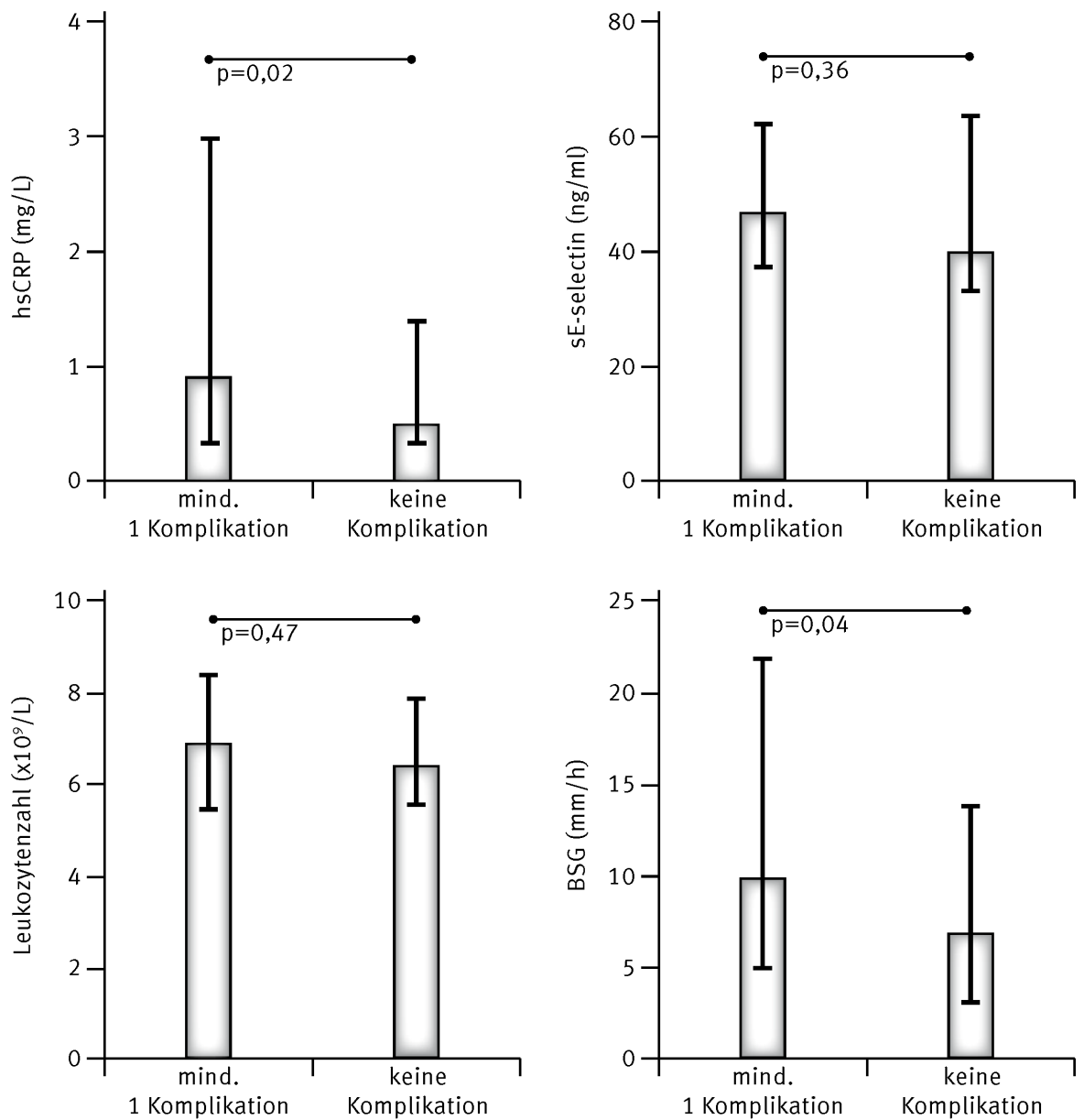


**Abbildung 3:** Durchschnittswert und Standardfehler der Entzündungsmarker angepasst an Diabetesdauer, HbA1c-Level und BMI.



hsCRP und BSG waren signifikant erhöht bei Studienteilnehmern mit vorhandenen Diabeteslangzeitkomplikationen im Vergleich mit denen ohne Komplikationen: 0,9 (0,3 – 2,7) mg/L vs. 0,5 (0,3 – 1,4) mg/L ( $p = 0,02$ ) und 10,0 (5,0 – 22,0) mm/h vs. 7,0 (3,5 – 14,0) mm/h ( $p = 0,04$ ).

**Abbildung 4:** Statistisch nicht-angepasste Mediane der Level der Entzündungsmarker sowie deren Quartilsabstände bei Teilnehmern mit bzw. ohne Komplikationen im Vergleich.



### ***Langzeitkomplikationen des Diabetes***

Unabhängig von der Krankheitsdauer litten Probanden mit T2D am häufigsten an chronischen Komplikationen durch ihren Diabetes gefolgt von T1D. Bei CFRD-Patienten traten am wenigsten Komplikationen auf. Mikroalbuminurie als Zeichen der diabetischen Nephropathie war am häufigsten bei T2D (19 % vs. 1 % bei T1D vs. 0 % bei CFRD). T1D-Patienten hatten am seltensten eine pathologische HVV (28 % vs. 54 % bei T2D vs. 50 % bei CFRD), insgesamt war diese jedoch die am häufigsten auftretende Komplikation. T1D-Patienten litten auch weniger an sensomotorischer Polyneuropathie als T2D (5 % vs. 19 %). Diabetische Retinopathie trat am häufigsten bei T1D auf (16 % vs. (T2D) 7 % vs. (CFRD) 8 %), jedoch lag hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Diabetesgruppen vor.

### ***Verbindungen zwischen Langzeitkomplikationen und klinischen Daten wie BMI und Entzündungsparameter***

HbA1c, BMI, Blutdruck und die Entzündungsmarker zeigten eine signifikante Assoziation mit den einzelnen Diabeteskomplikationen (Tabelle 2). Mit dem Auftreten einer Langzeitkomplikation im Allgemeinen waren die BSG sowie HbA1c, BMI und Blutdruck assoziiert. Die Entzündungsmarker hsCRP, Leukozytenzahl und BSG waren mit HVV assoziiert. Eine erhöhte BSG war auch mit den mikrovaskulären Komplikationen Retinopathie, sensomotorischer Polyneuropathie und Nephropathie assoziiert.



**Tabelle 2:** Assoziation von Variablen mit Diabeteskomplikationen

		<b>Univariat</b>	<b>Angepasst für Alter und Geschlecht</b>	<b>Multivariat</b>
Komplikation	Erklärende Variable	p-Wert	p-Wert	p-Wert
mind. eine Komplikation (n=192)	HbA1c	<b>0,01</b>	<b>0,008</b>	<b>0,008</b>
	BMI	<b>0,02</b>	<b>0,027</b>	<b>0,03</b>
	Diastolischer BD	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	n.s.
	BSG	<b>0,02</b>	<b>0,019</b>	<b>0,04</b>
Mikrovaskuläre Komplikationen (n=43)	HbA1c	<b>0,008</b>	<b>0,013</b>	<b>0,004</b>
	BMI	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,001</b>
	Systolischer BD Diastolischer BD	<b>0,007</b> <b>0,01</b>	<b>0,025</b>	n.s.
	BSG	<b>0,006</b>	<b>0,012</b>	n.s.
HVV (n=176)	BMI	<b>0,015</b>	<b>0,02</b>	n.s.
	Systolischer BD Diastolischer BD	<b>&lt;0,001</b> <b>0,001</b>	<b>&lt;0,001</b> <b>0,002</b>	<b>&lt;0,001</b> <b>0,009</b>
	hsCRP	<b>0,019</b>	<b>0,021</b>	<b>0,037</b>
	Leukozytenzahl	<b>0,049</b>	n.s.	n.s.
	BSG	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>

Multivariates Modell: erklärende Variable angepasst für Alter, Geschlecht, BMI, BD und HbA1c

*Verbindungen zwischen Entzündungsmarkern und klinischen Charakteristika*

Der Diabetestyp zeigt eine signifikante Assoziation mit allen bestimmten Entzündungsmarkern (Tabelle 3). Der BMI und das Alter sind mit hsCRP und BSG assoziiert und das Geschlecht mit Leukozytenzahl und BSG.

**Tabelle 3:** Assoziation von Variablen mit Entzündungsmarkern

		<b>Univariat</b>	<b>Multivariat</b>
Entzündungsmarker	Erklärende Variable	p-Wert	p-Wert
sE-selectin	Alter	<b>0,01</b>	n.s.
	Diabetesdauer	<b>&lt;0,001</b>	n.s.
	Diabetestyp	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
hsCRP	Alter	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
	BMI	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
	Diabetestyp	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
Leukozytenzahl	Geschlecht	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
	Diabetesdauer	<b>0,01</b>	n.s.
	Diabetestyp	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
BSG	Geschlecht	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
	Alter	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>
	BMI	<b>0,02</b>	<b>0,001</b>
	Diabetestyp	<b>0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>

Multivariates Modell: erklärende Variable angepasst für Alter, Geschlecht, Diabetesdauer, BMI, ggf. Diabetestyp

In Tabelle 4 ist die Verteilung der Gewichtskategorien nach BMI in T1D, T2D und CFRD abgebildet. Wie vermutet trat Adipositas am häufigsten in der T2D-Gruppe und Untergewicht am meisten bei CFRD auf. Von der T1D-Gruppe waren 40 % übergewichtig oder adipös. Entzündungsmarker und Komplikationsstatus wurden in Bezug auf das Gewicht untersucht (Untergewicht, Normalgewicht, Übergewicht, Adipositas). Beobachtet wurden unterschiedliche Level von Entzündungsmarkern je nach Körpergewicht. Insbesondere adipöse Patienten hatten im Vergleich zu den anderen Gewichtskategorien erhöhte Level von nahezu allen Entzündungsmarkern. Nur die Leukozytenzahl war signifikant bei den untergewichtigen Patienten erhöht. Es konnte auch beobachtet werden, dass es zu einem erhöhten Auftreten von mikrovaskulären Komplikationen mit steigendem BMI kam.

Bei nur sehr wenigen untergewichtigen Teilnehmern wurde eine Gruppierung der untergewichtigen mit den normalgewichtigen durchgeführt, die Unterschiede zwischen hsCRP und der Prävalenz der Komplikationen blieb weiterhin signifikant.

**Tabelle 4:** Level der Entzündungsmarker und Prävalenzen der Diabeteskomplikationen in verschiedenen Gewichtskategorien.

<b>Ergebnis</b>	Untergewichtig (<15. Perzentile)	Normal (≥ 15. & ≤ 85. Perzentile)	Übergewichtig (>85. & <97. Perzentile)	Adipös (≥ 97. Perzentile)	p-Wert*
% aller Diabetes- patienten	4	54	27	15	<b>&lt;0,001</b>
T1D	1	59	32	8	
T2D	0	6	31	63	
CFRD	16	81	3	0	
hsCRP (mg/L)	0,12 [0,10–0,13]	0,44 [0,23–1,46]	1,04 [0,38–1,52]	2,94 [1,24–5,24]	<b>0,001</b>
sE-selectin (ng/ml)	44,0 [35,0–52,9]	47,6 [33,3–63,9]	43,4 [34,3–57,8]	51,5 [40,6–76,0]	0,8
Leukozyten (x10 <sup>9</sup> /L)	8,7 [6,5–14,0]	6,6 [5,4–7,7]	6,5 [5,7–8,1]	7,9 [5,5–9,7]	<b>&lt;0,001</b>
BSG (mm/h)	5 [3–14]	8 [4–16,8]	7 [3–15]	14,5 [8,3– 29,8]	0,6
Jegliche Komplikation**	4/7 [57 %]	63/104 [61 %]	37/52 [71 %]	23/29 [79 %]	0,2
Mikroalbuminurie	0/5 [0 %]	1/90 [1 %]	3/46 [7 %]	3/20 [15 %]	<b>0,04</b>
HVV	3/7 [43 %]	30/95 [32 %]	13/47 [28 %]	15/26 [58 %]	0,05
Sensomotorische Polyneuropathie	0/7 [0 %]	3/103 [3 %]	1/50 [2 %]	8/29 [28 %]	<b>&lt;0,001</b>
Retinopathie	0/6 [0 %]	13/102 [13 %]	10/51 [20 %]	2/29 [7 %]	0,3

\* One way ANOVA oder 4x2 chi-square-Test.

\*\* Entweder Mikroalbuminurie, HVV, sensomotorische Polyneuropathie oder Retinopathie.

## **Diskussion**

In dieser Querschnittsstudie mit Kindern und Jugendlichen mit T1D, T2D und CFRD wollten wir Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Diabetestypen, verschiedenen Entzündungsmarkern und Langzeitkomplikationen durch Diabetes beleuchten. Nach unserem Kenntnisstand handelt es sich hierbei um die erste Studie dieser Art, die diese Zusammenhänge bei drei häufigen Diabetestypen bei jungen Patienten untersucht. Wir fanden signifikante Unterschiede in den Leveln von Entzündungsmarkern zwischen den verschiedenen Diabetestypen sowie in den Prävalenzen von diabetischen Langzeitkomplikationen. Auch wurde ein Zusammenhang von erhöhtem Körpergewicht, dem Auftreten von Komplikationen und erhöhten Entzündungsmarkern beleuchtet.

### Die untersuchten Entzündungsmarker als Biomarker

Insgesamt waren die Level der Biomarker für Inflammation vergleichbar hoch bei T2D und CFRD Teilnehmern und signifikant höher als bei T1D. Auch im Vergleich zu den Referenzgruppen waren die Level von hsCRP und sE-selectin bei den Diabetespatienten numerisch, aber nicht statistisch signifikant erhöht. hsCRP und BSG waren bei den Teilnehmern mit Langzeitkomplikationen erhöht im Vergleich zu Diabetikern ohne Komplikationen.

CRP wird in vaskulärem und nicht-vaskulärem Gewebe gebildet. Die American Heart Association Guidelines berichten, dass bei Werten von <1, 1–2, 2–3 und >3 mg/L ein normales, geringes, mittleres, hohes und sehr hohes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen besteht (9). Level von größer als 10 mg/L sind oft Zeichen einer akuten Infektion (46). Bereits in unserer jungen T2D Teilnehmergruppe waren das hsCRP Level hoch, übereinstimmend mit einem mittleren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen. Die hsCRP Level bei CFRD waren nach Adjustierung für Kovarianten,

die ebenfalls mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergehen, sogar noch höher als bei T2D. Daraus ist zu schließen, dass das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, das durch Entzündung entsteht, in CFRD ähnlich hoch, wenn nicht sogar höher als bei T2D ist (47).

Die BSG als klinisch leicht zugänglicher Laborparameter zeigte ein vielversprechendes Potential als Biomarker für Diabeteskomplikationen im Allgemeinen. Insbesondere HVV waren mit erhöhter BSG, Leukozytenzahl und hsCRP assoziiert. Bereits zuvor wurde über einer Assoziation von HVV mit hsCRP berichtet (48, 49), nach unserem Wissensstand jedoch nicht über die mit Leukozytenzahl und BSG.

#### Die beobachteten Langzeitkomplikationen und daraus resultierende Konsequenzen

Obwohl es sich um eine noch sehr junge Studienpopulation mit einem Durchschnittsalter von 16,2 Jahren und einer kurzen Diabetesdauer von 1,8 Jahren bei T2D bis zu 8,1 Jahren bei T1D handelte, waren die Prävalenzen für Langzeitkomplikationen wie retinale, renale und neurologische Veränderungen in allen drei Diabetesgruppen bereits sehr hoch (56-72%). Bei T2D und CFRD kam es in unserer Studiengruppe zum vermehrten Auftreten von Langzeitkomplikationen, die durch Diabetes verursacht wurden. Dabei ist unbedingt zu beachten, dass anders als bei T1D, dessen Erstmanifestation immer mit einer akuten klinischen Symptomatik verbunden ist, T2D und CFRD einen schleichenden, asymptomatischen Verlauf nehmen und bereits Jahre vor Diagnose bestehen können. Das unterstreicht die Notwendigkeit von regelmäßigen und frühzeitigen Screenings auf Diabetes bei CF Patienten und Kindern und Jugendlichen mit erhöhtem Risiko für T2D. Zu diesen Risikofaktoren gehören Adipositas, Zugehörigkeit zu einer ethnischen Gruppe mit erhöhtem Risiko für T2D (z.B. Asiaten, Lateinamerikaner, Ureinwohner Nordamerikas und Australiens) und eine positive Familienanamnese im Sinne von Eltern oder Großeltern, die an T2D leiden

(24). Die potentielle Beeinflussung der Ergebnisse der Studie durch die unterschiedlich lange Diabetesdauer der Probanden wurde akzeptiert, da mit einer angepassten, verlängerter Krankheitsdauer von T2D und CFRD mit großer Wahrscheinlichkeit noch mehr Teilnehmer an chronischen Komplikationen gelitten hätten und die Ergebnisse noch deutlich ausgefallen wären.

Autonome Neuropathie in Form einer pathologischen HVV war die insgesamt am häufigsten auftretende Komplikation bei allen drei Diabetesformen in unserer Studie. Obwohl ein Screening mit einem EKG-Gerät, wie es den meisten Kliniken zur Verfügung steht, einfach und schnell durchgeführt werden kann, gehört die Erfassung von HVV nicht zu den Standardverfahren beim Screening für Langzeitkomplikationen durch Diabetes, obwohl die kardiovaskuläre, autonome Neuropathie einer der Hauptgründe für Morbidität und Mortalität bei Diabetes ist (50). Sie kann zur orthostatischen Hypotension, Ruhetachykardie und silenten Myokardinfarkten führen. Trotzdem sind HVV noch extrem unterdiagnostiziert bei Diabetes.

Während Retinopathie und periphere sensomotorische Polyneuropathie trotz unterschiedlicher Krankheitsdauer gleich häufig bei allen Diabetesformen auftraten, kamen Mikroalbuminurie und HVV vermehrt bei T2D vor. Damit waren Komplikationen bei der Patientengruppe mit T2D in unserer Studie am häufigsten. Bereits in früheren Studien wurde festgestellt, dass T2D mit höheren Komplikationsraten einhergeht, jedoch vor allem bei älteren Patienten mit längerer Diabetesdauer (29-31).

Bisher ist noch nicht viel über diabetische Langzeitkomplikationen bei CFRD bekannt, insbesondere bei einer so kurzen Diabetesdauer wie in unserem Falle. Noch vor wenigen Jahren war die Lebenserwartung der Patienten mit CF deutlich verkürzt und CFRD Patienten erreichten oft nicht ein Alter, in dem sie Langzeitkomplikationen durch Diabetes entwickelt hätten. Mit der ansteigenden Lebenserwartung, von aktuell 45

Jahren (32), werden diese Diabetesform, die entstehenden Komplikationen und die Erkennung sowie Kontrolle von Risikofaktoren zunehmend wichtiger.

#### Der unterschätzte Diabetes bei CF

Nach heutigem Kenntnisstand ist die Verbindung zwischen den pathologischen Veränderungen des Glukosestoffwechsels und der Mutation des *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) Proteins noch nicht komplett verstanden und die Faktoren, die bei der Entstehung der chronischen Komplikationen von CFRD eine Rolle spielen, sind noch unklarer. Jedoch scheint ein Entzündungsprozess Teil der Pathologie zu sein. Es wird angenommen, dass bei CF eine Obstruktion der Pankreasgänge zu einer exokrinen und endokrinen Pankreasdysfunktion führen kann (37). Außerdem kommt es im Respirationstrakt zu Obstruktionen mit Zerstörung von Epithel und der Proliferation von Bakterien (38). Somit ist CF im Allgemeinen eine Erkrankung, die durch eine chronische, systemische und pulmonale Entzündung, auch in Abwesenheit von Keimen, gekennzeichnet ist (39, 40). Mit Diabetes als Komorbidität, die 50% der CF Patienten im Alter von 30 Jahren betrifft (41), wird auch die vaskuläre Entzündung ein Thema dieser komplexen Erkrankung. In unserer Studie sahen wir ähnlich hohe systemische und vaskuläre Entzündungsmarker bei CFRD wie bei T2D und höhere Prävalenzen für HVV und Retinopathie als vorangegangene Studien, was darauf hindeuten könnte, dass das Risiko für Langzeitkomplikationen auch bei CFRD alarmierend hoch ist im Vergleich zu T1D und bisher unterschätzt wurde (36, 42). Zukünftige Untersuchungen, inklusive der Analyse von weiteren Allgemein- sowie vaskulär-spezifischen Entzündungsmarkern (z.B. sVCAM-1, sICAM-1 und Interleukin-8 (51, 52)) könnten uns einen tieferen Einblick in Entzündungsprozesse bei CFRD geben. Außerdem stellten wir fest, dass sE-selectin, welches von arteriellen Endothelzellen ausgeschüttet wird und ein Zeichen für vaskuläre Entzündung ist, nicht



nur in der CFRD Gruppe stark erhöht war, sondern auch in der nicht-diabetischen CF ähnlich hohe Level gemessen wurden. Dies legt nahe, dass es auch ohne Diabetes zu endothelialer Dysfunktion bei CF kommt.

### Diagnostische und therapeutische Konsequenzen

Unsere Ergebnisse von höheren Leveln von systemischen und vaskulären Entzündungsmarkern bei Jugendlichen mit T2D und CFRD mit und ohne Langzeitkomplikationen und der Trend von höheren Entzündungsmarkern im Vergleich zu den Referenzgruppen unterstützen die Vorstellung von einem Zusammenhang zwischen Entzündung und der Pathogenese von chronischen Diabetesfolgen. Dies wurde bereits für Retinopathie (53), Nephropathie (54) und Atherosklerosis diskutiert und unsere Ergebnisse legen nahe, dass es auch für autonome Polyneuropathie zutrifft. Mit weitergehenden Untersuchungen könnten diese Entzündungsmarker zu nützlichen prognostischen Markern werden, um das individuelle Risiko eines Diabetespatienten für Komplikationen zu evaluieren und im Verlauf zu beurteilen. Außerdem lassen unsere Ergebnisse vermuten, dass es einen potentiellen Nutzen von antiinflammatorischen Medikamenten bei Diabetes geben könnte und diese zur Prävention von Komplikationen beitragen könnten. Es wurde bereits gezeigt, dass der Gebrauch von Medikamenten wie nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAP) zu reduzierten Leveln von Entzündungsmarkern führt und auch den Glukosestoffwechsel positiv beeinflusst (55). Statine und ACE-Hemmer, die zur Reduktion von vaskulären Schäden genutzt werden, können auch Inflammationsmarker reduzieren (56, 57).

Ein weiteres wichtiges Ergebnis der Studie ist der Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Komplikationen und BMI. Somit sollte ein weiterer Punkt unter den therapeutischen Zielen bei Diabetes die Reduktion der Stammfettleibigkeit nicht nur bei T2D Patienten, aber auch T1D und, wenn relevant, bei CFRD Patienten sein, denn

bereits in unserer jungen Studiengruppe traten mit einem erhöhten BMI höhere Entzündungsmarker und vermehrte chronische Diabetesfolgen auf. Auch andere vor uns haben bereits dieses Phänomen beobachtet (58, 59) und es durch die Produktion von Zytokinen durch das Fettgewebe erklärt, die wiederum die Produktion weiterer Entzündungsmarker wie CRP auslösen (60).

Im Gegensatz zu früheren Studien konnten wir keine wesentlichen geschlechterspezifische Unterschiede bei dem Auftreten von Komplikationen oder der Level der Entzündungsmarker finden (61-63). In anderen Studien zeigten sich erhöhte Werte von CRP bei Frauen in Verbindung mit erhöhtem Körperfett bei Frauen (64-66).

### Ein Fazit

Zu den Stärken unserer Studie zählt vor allem, dass wir erstmalig einen Vergleich von Entzündungsprozessen zwischen drei verschiedenen Diabetestypen bei Jugendlichen durchgeführt haben. Wir hatten Zugang zu vielen klinischen Daten der Teilnehmer, insbesondere ihre detaillierte Komplikationsstadien. Unsere Studienpopulation hatte wenig Komorbiditäten und andere Risikofaktoren für veränderte Entzündungswerte wie regelmäßiges Rauchen oder regelmäßiger Gebrauch von NSAP. Außerdem wurden verschiedene Entzündungsmarker gemessen, die bereits in klinischen Laboren routinemäßig bestimmt werden, sodass die durchgeführten Messungen in unserer Studie einfach durch andere reproduziert und auch im klinischen Alltag genutzt werden könnten.

Die Grenzen unserer Studie lagen in ihrem Design als Querschnittsstudie, sodass wir die Entzündungswerte nur zu einem bestimmten Zeitpunkt erfasst haben. Eine Veränderung der Entzündungswerte mit fortschreitender Diabetesdauer wäre von großem Interesse gewesen. Leider war es auch nicht möglich, alle Biomarker bei den nicht-diabetischen Teilnehmern zu bestimmen, sodass wir für die klinisch weiter verbreiteten

Entzündungsmarker auf Normwerte für den Vergleich zurückgreifen mussten. Durch die geringe Teilnehmeranzahl war eine Analyse anhand der einzelnen Komplikationen nicht möglich und es fand eine Gruppierung der Komplikationen statt. Andere Biomarker der vaskulären Funktion (sVCAM-1, sICAM und vaskuläre Reaktivität) sowie neue Marker für vaskuläre Schäden (z.B. oxidativen Stress, microRNA) wären von Interesse.

Zusammenfassend wurden in dieser Querschnittsstudie mit Kindern und Jugendlichen mit T1D, T2D oder CFRD sowie nicht-diabetischen Referenzgruppen erhöhte Level von systemischen und vaskulären Entzündungsmarkern festgestellt, am höchsten in T2D und CFRD. Hohe Prävalenzen von Langzeitkomplikationen durch Diabetes wurden bereits nach kurzer Krankheitsdauer beobachtet und waren verknüpft mit BMI, HbA1c und Blutdruck. Ein erhöhter BMI trat bei den Probanden gehäuft auf und war assoziiert mit erhöhten Entzündungsmarkern und vermehrten Vorkommen von Komplikationen. Frühe Screenings auf T2D und CFRD für Risikogruppen sowie auf Langzeitkomplikationen in allen Diabetesformen im Jugendalter sind von großer Bedeutung, sodass durch eine frühe Diagnose präventive Schritte eingeleitet werden können. Inflammation scheint sowohl Ursache als auch Folge von Diabetes und seinen Komplikationen zu sein und könnte potentiell therapiert werden. Größere und longitudinale Studien sowie Interventionsstudien mit NSAP wären in Zukunft von Interesse.

## Referenzen

1. Zhou B, Lu Y, Hajifathalian K, Bentham J, Di Cesare M, Danaei G, Bixby H, Cowan MJ, Ali MK, Taddei C, Lo WC, Reis-Santos B, Stevens GA, Riley LM, Miranda JJ, Bjerregaard P, Rivera JA, Fouad HM, Ma G, Mbanya JC, McGarvey ST, Mohan V, Onat A, Pilav A, Ramachandran A, Romdhane HB, Paciorek CJ, Bennett JE, Ezzati M, Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4·4 million participants. *The Lancet*. 2016; 387:1513-30.
2. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *The Journal of clinical investigation*. 1995; 96:60-8.
3. Domingueti CP, Dusse LM, Carvalho M, de Sousa LP, Gomes KB, Fernandes AP. Diabetes mellitus: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *Journal of diabetes and its complications*. 2016; 30:738-45.
4. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420:868-74.
5. Garcia Frade LJ, de la Calle H, Alava I, Navarro JL, Creighton LJ, Gaffney PJ. Diabetes mellitus as a hypercoagulable state: its relationship with fibrin fragments and vascular damage. *Thrombosis research*. 1987; 47:533-40.
6. Anderson EA, Hoffman RP, Balon TW, Sinkey CA, Mark AL. Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans. *The Journal of clinical investigation*. 1991; 87:2246-52.
7. Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in immunology*. 2018; 9:754.
8. Choi J, Joseph L, Pilote L. Obesity and C-reactive protein in various populations: a systematic review and meta-analysis. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2013; 14:232-44.
9. Goff DC, Jr., Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Sr., Gibbons R, Greenland P, Lackland DT, Levy D, O'Donnell CJ, Robinson JG, Schwartz JS,

- Shero ST, Smith SC, Jr., Sorlie P, Stone NJ, Wilson PW. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014; 63:2935-59.
10. Targher G, Bertolini L, Zoppini G, Zenari L, Falezza G. Increased plasma markers of inflammation and endothelial dysfunction and their association with microvascular complications in Type 1 diabetic patients without clinically manifest macroangiopathy. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2005; 22:999-1004.
  11. Gedebjerg A, Almdal TP, Berencsi K, Rungby J, Nielsen JS, Witte DR, Friborg S, Brandslund I, Vaag A, Beck-Nielsen H, Sørensen HT, Thomsen RW. Prevalence of micro- and macrovascular diabetes complications at time of type 2 diabetes diagnosis and associated clinical characteristics: A cross-sectional baseline study of 6958 patients in the Danish DD2 cohort. *Journal of diabetes and its complications*. 2018; 32:34-40.
  12. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84:9238-42.
  13. Matsumoto K, Sera Y, Ueki Y, Inukai G, Niiro E, Miyake S. Comparison of serum concentrations of soluble adhesion molecules in diabetic microangiopathy and macroangiopathy. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2002; 19:822-6.
  14. Lopes-Virella MF, Carter RE, Gilbert GE, Klein RL, Jaffa M, Jenkins AJ, Lyons TJ, Garvey WT, Virella G. Risk factors related to inflammation and endothelial dysfunction in the DCCT/EDIC cohort and their relationship with nephropathy and macrovascular complications. *Diabetes Care*. 2008; 31:2006-12.
  15. Kashima S, Inoue K, Matsumoto M, Akimoto K. White Blood Cell Count and C-Reactive Protein Independently Predicted Incident Diabetes: Yuport Medical Checkup Center Study. *Endocrine research*. 2019; 44:127-37.
  16. Vozarova B, Weyer C, Lindsay RS, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA. High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002; 51:455-61.

17. Ford ES. Leukocyte count, erythrocyte sedimentation rate, and diabetes incidence in a national sample of US adults. *American journal of epidemiology*. 2002; 155:57-64.
18. Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009; 94:3171-82.
19. Kern TS. Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Experimental diabetes research*. 2007; 2007:95103.
20. Mora C, Navarro JF. Inflammation and diabetic nephropathy. *Current diabetes reports*. 2006; 6:463-8.
21. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (New York, NY)*. 1993; 259:87-91.
22. Sibley SD, Thomas W, de Boer I, Brunzell JD, Steffes MW. Gender and elevated albumin excretion in the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) cohort: role of central obesity. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2006; 47:223-32.
23. Price SA, Gorelik A, Furlanos S, Colman PG, Wentworth JM. Obesity is associated with retinopathy and macrovascular disease in type 1 diabetes. *Obesity research & clinical practice*. 2014; 8:e178-82.
24. Shaw J. Epidemiology of childhood type 2 diabetes and obesity. *Pediatric diabetes*. 2007; 8 Suppl 9:7-15.
25. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *Jama*. 2001; 286:327-34.
26. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *The New England journal of medicine*. 1993; 329:977-86.

27. Krolewski AS, Warram JH, Christlieb AR, Busick EJ, Kahn CR. The changing natural history of nephropathy in type I diabetes. *The American journal of medicine.* 1985; 78:785-94.
28. Donaghue KC, Chiarelli F, Trotta D, Allgrove J, Dahl-Jorgensen K. Microvascular and macrovascular complications associated with diabetes in children and adolescents. *Pediatric diabetes.* 2009; 10:195-203.
29. Eppens MC, Craig ME, Cusumano J, Hing S, Chan AK, Howard NJ, Silink M, Donaghue KC. Prevalence of diabetes complications in adolescents with type 2 compared with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2006; 29:1300-6.
30. Song SH. Complication characteristics between young-onset type 2 versus type 1 diabetes in a UK population. *BMJ open diabetes research & care.* 2015; 3:e000044.
31. Constantino MI, Molyneaux L, Limacher-Gisler F, Al-Saeed A, Luo C, Wu T, Twigg SM, Yue DK, Wong J. Long-term complications and mortality in young-onset diabetes: type 2 diabetes is more hazardous and lethal than type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2013; 36:3863-9.
32. Foundation CF. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry, 2015 Annual Data Report. 2015 Annual Data Report. Cystic Fibrosis Foundation, Bethesda, Maryland, 2016.
33. Moran A, Doherty L, Wang X, Thomas W. Abnormal glucose metabolism in cystic fibrosis. *The Journal of pediatrics.* 1998; 133:10-7.
34. Moran A, Pyzdrowski KL, Weinreb J, Kahn BB, Smith SA, Adams KS, Seaquist ER. Insulin Sensitivity in Cystic Fibrosis. *Diabetes.* 1994; 43:1020-6.
35. Moran A, Dunitz J, Nathan B, Saeed A, Holme B, Thomas W. Cystic Fibrosis–Related Diabetes: Current Trends in Prevalence, Incidence, and Mortality. *Diabetes Care.* 2009; 32:1626-31.
36. Schwarzenberg SJ, Thomas W, Olsen TW, Grover T, Walk D, Milla C, Moran A. Microvascular complications in cystic fibrosis-related diabetes. *Diabetes Care.* 2007; 30:1056-61.
37. Lohr M, Goertchen P, Nizze H, Gould NS, Gould VE, Oberholzer M, Heitz PU, Kloppel G. Cystic fibrosis associated islet changes may provide a basis for

- diabetes. An immunocytochemical and morphometrical study. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology*. 1989; 414:179-85.
38. Rottner M, Tual-Chalot S, Mostefai HA, Andriantsitohaina R, Freyssinet JM, Martinez MC. Increased oxidative stress induces apoptosis in human cystic fibrosis cells. *PloS one*. 2011; 6:e24880.
  39. Conese M, Copreni E, Di Gioia S, De Rinaldis P, Fumarulo R. Neutrophil recruitment and airway epithelial cell involvement in chronic cystic fibrosis lung disease. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2003; 2:129-35.
  40. Courtney JM, Dunbar KE, McDowell A, Moore JE, Warke TJ, Stevenson M, Elborn JS. Clinical outcome of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis adults. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2004; 3:93-8.
  41. Andersen HU, Lanng S, Pressler T, Laugesen CS, Mathiesen ER. Cystic fibrosis-related diabetes: the presence of microvascular diabetes complications. *Diabetes Care*. 2006; 29:2660-3.
  42. van den Berg JM, Morton AM, Kok SW, Pijl H, Conway SP, Heijerman HG. Microvascular complications in patients with cystic fibrosis-related diabetes (CFRD). *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2008; 7:515-9.
  43. Kromeyer-Hauschild K WM, Geller F, Ziegler A, Geiß HC, Hesse V, v. Hippel, Jaeger U, Johnsen D, Kiess W, Korte W, Kunze D, Menner K, Müller M, Niemann-Pilatus A, Remer Th, Schaefer F, Wittchen HU, Zabransky S, Zellner K, Hebebrand J. Perzentile für den Body Mass Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. *Monatsschrift Kinderheilkunde*. 2001; 149.
  44. Falkner B, Gidding SS, Portman R, Rosner B. Blood pressure variability and classification of prehypertension and hypertension in adolescence. *Pediatrics*. 2008; 122:238-42.
  45. Hoq M, Matthews S, Karlaftis V, Burgess J, Cowley J, Donath S, Carlin J, Yen T, Ignjatovic V, Monagle P. Reference Values for 30 Common Biochemistry Analytes



- Across 5 Different Analyzers in Neonates and Children 30 Days to 18 Years of Age. *Clin Chem.* 2019; 65:1317-26.
46. Huizen J. What does it mean if you have a high C-reactive protein? *MedicalNewsToday*2018.
  47. O'Shea D, O'Connell J. Cystic fibrosis related diabetes. *Current diabetes reports.* 2014; 14:511.
  48. Anan F, Takahashi N, Nakagawa M, Ooie T, Saikawa T, Yoshimatsu H. High-sensitivity C-reactive protein is associated with insulin resistance and cardiovascular autonomic dysfunction in type 2 diabetic patients. *Metabolism: clinical and experimental.* 2005; 54:552-8.
  49. Muni RH, Kohly RP, Lee EQ, Manson JE, Semba RD, Schaumberg DA. Prospective study of inflammatory biomarkers and risk of diabetic retinopathy in the diabetes control and complications trial. *JAMA ophthalmology.* 2013; 131:514-21.
  50. Dimitropoulos G, Tahrani AA, Stevens MJ. Cardiac autonomic neuropathy in patients with diabetes mellitus. *World journal of diabetes.* 2014; 5:17-39.
  51. Chmiel JF, Davis PB. State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respiratory research.* 2003; 4:8.
  52. Bergin DA, Hurley K, Mehta A, Cox S, Ryan D, O'Neill SJ, Reeves EP, McElvaney NG. Airway inflammatory markers in individuals with cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Journal of inflammation research.* 2013; 6:1-11.
  53. Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK, Freeman WM, Gardner TW, Jefferson LS, Kester M, Kimball SR, Krady JK, LaNoue KF, Norbury CC, Quinn PG, Sandirasegarane L, Simpson IA. Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes.* 2006; 55:2401-11.
  54. Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clinical science (London, England : 1979).* 2013; 124:139-52.

55. Fleischman A, Shoelson SE, Bernier R, Goldfine AB. Salsalate improves glycemia and inflammatory parameters in obese young adults. *Diabetes Care*. 2008; 31: 289-94.
56. Jialal I, Miguelino E, Griffen SC, Devaraj S. Concomitant reduction of low-density lipoprotein-cholesterol and biomarkers of inflammation with low-dose simvastatin therapy in patients with type 1 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007; 92:3136-40.
57. Fliser D, Buchholz K, Haller H. Antiinflammatory effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade in hypertensive patients with microinflammation. *Circulation*. 2004; 110:1103-7.
58. Gray N, Picone G, Sloan F, Yashkin A. Relation between BMI and diabetes mellitus and its complications among US older adults. *Southern medical journal*. 2015; 108:29-36.
59. Reinehr T, Karges B, Meissner T, Wiegand S, Stoffel-Wagner B, Holl RW, Woelfle J. Inflammatory Markers in Obese Adolescents with Type 2 Diabetes and Their Relationship to Hepatokines and Adipokines. *The Journal of pediatrics*. 2016; 173:131-5.
60. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppel SW. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997; 82:4196-200.
61. Monti MC, Lonsdale JT, Montomoli C, Montross R, Schlag E, Greenberg DA. Familial risk factors for microvascular complications and differential male-female risk in a large cohort of American families with type 1 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007; 92:4650-5.
62. Cho YH, Craig ME, Donaghue KC. Puberty as an accelerator for diabetes complications. *Pediatric diabetes*. 2014; 15:18-26.
63. Zoffmann V, Vistisen D, Due-Christensen M. A cross-sectional study of glycaemic control, complications and psychosocial functioning among 18- to 35-year-old adults with type 1 diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2014; 31:493-9.

64. Cartier A, Cote M, Lemieux I, Perusse L, Tremblay A, Bouchard C, Despres JP. Sex differences in inflammatory markers: what is the contribution of visceral adiposity? *The American journal of clinical nutrition*. 2009; 89:1307-14.
65. Thorand B, Baumert J, Doring A, Herder C, Kolb H, Rathmann W, Giani G, Koenig W. Sex differences in the relation of body composition to markers of inflammation. *Atherosclerosis*. 2006; 184:216-24.
66. Connelly PW, Hanley AJ, Harris SB, Hegele RA, Zinman B. Relation of waist circumference and glycemic status to C-reactive protein in the Sandy Lake Ojibwe. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2003; 27:347-54.

### 3. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Juliane Aulich, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Entzündungsmarker und ihre Verbindung mit verschiedenen Diabetestypen und -langzeitkomplikationen bei Jugendlichen** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§ 156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift

## **Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation**

Publikation 1: Juliane Aulich, Yoon Hi Cho, Andrzej S Januszewski, Maria E Craig, Hiran Selvadurai, Susanna Wiegand, Alicia J Jenkins, Kim C Donaghue: **Associations between circulating inflammatory markers, diabetes type and complications in youth**, Pediatric Diabetes, [Dezember 2019]

### **Beitrag im Einzelnen:**

Für meine Forschungsarbeit habe ich in Zusammenarbeit mit meinen Betreuern zunächst einen thematischen Schwerpunkt für die Arbeit und ein Konzept für den Ablauf erarbeitet, wobei das Studiendesign bereits zuvor festgelegt worden war. Ein Teil der Teilnehmer war bereits rekrutiert worden und die klinischen Daten und Tests für das Komplikationsscreening sowie Blutentnahmen waren durchgeführt worden. In einer intensiven Literaturrecherche bereitete ich mich auf die Thematik vor und erarbeitete den aktuellen Forschungsstand zu entzündlichen Vorgängen bei jugendlichen Patienten mit Diabetes. Wir erweiterten die Studie um eine Kontrollgruppe mit Jugendlichen mit zystischer Fibrose mit normaler Glukosetoleranz. Daraufhin rekrutierte ich weitere Studienteilnehmer für die Studiengruppen mit zystischer Fibrose und CFRD. Anschließend führte ich die laborchemischen Untersuchungen der Blutprodukte aller Teilnehmer auf hsCRP sowie sE-selectin durch. Nach dem Zusammentragen aller weiteren klinischen Daten der Probanden begann ich mit Unterstützung meiner Kollegen die statistische Auswertung der Daten. In Form von Abbildung 2 und 3 sowie Tabellen 1 bis 3 präsentierte ich die Hauptergebnisse der Studie. Die Publikation wurde durch mich verfasst und durch das gesamte Team im Verlauf angepasst. Im Verlauf stellte ich die Ergebnisse unserer Studie im Rahmen von mündlichen Posterpräsentationen auf drei internationalen Kongressen vor. Anschließend bereitete ich unser Manuskript für die Einreichung bei dem gewünschten Publikationsjournal vor, reichte es ein und führte in Zusammenarbeit mit meinen Kollegen Änderungen nach der Revision durch, bevor die Arbeit im Dezember 2019 erfolgreich publiziert wurde.

---

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## 4. Auszug Journal List

Journal Data Filtered By: Selected JCR Year: 2017 Selected Editions: SCIE,SSCI

Selected Categories: "PEDIATRICS" Selected Category Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 124 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	JAMA Pediatrics	5,870	10.769	0.033730
2	JOURNAL OF THE AMERICAN ACADEMY OF CHILD AND ADOLESCENT PSYCHIATRY	19,482	6.250	0.019260
3	PEDIATRICS	77,301	5.515	0.118620
4	PEDIATRIC ALLERGY AND IMMUNOLOGY	4,341	4.137	0.006970
5	JOURNAL OF ADOLESCENT HEALTH	14,174	4.098	0.026400
6	Pediatric Obesity	1,632	3.980	0.007020
7	Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition	3,893	3.953	0.009610
8	JOURNAL OF PEDIATRICS	31,289	3.667	0.047810
9	EUROPEAN CHILD & ADOLESCENT PSYCHIATRY	4,492	3.553	0.007980
10	Seminars in Fetal & Neonatal Medicine	2,246	3.435	0.005380
11	DEVELOPMENTAL MEDICINE AND CHILD NEUROLOGY	11,671	3.289	0.013680
12	ARCHIVES OF DISEASE IN CHILDHOOD	16,281	3.258	0.015810
13	Maternal and Child Nutrition	2,405	3.233	0.006190
14	<b>PEDIATRIC DIABETES</b>	<b>3,033</b>	<b>3.161</b>	<b>0.007530</b>
15	PEDIATRIC PULMONOLOGY	6,730	3.157	0.009940
16	PEDIATRIC RESEARCH	13,691	3.123	0.015050
17	Pediatric Critical Care Medicine	5,763	3.092	0.011600

# 5. Publikation

Received: 19 March 2019 | Revised: 26 July 2019 | Accepted: 8 August 2019


DOI: 10.1111/peci.12913

## COMPLICATIONS



WILEY

## Associations between circulating inflammatory markers, diabetes type and complications in youth

Juliane Aulich<sup>1,2</sup> | Yoon Hi Cho<sup>2</sup> | Andrzej S. Januszewski<sup>3</sup> | Maria E. Craig<sup>2,4,5</sup>  | Hiran Selvadurai<sup>4,6</sup> | Susanna Wiegand<sup>1</sup> | Alicia J. Jenkins<sup>3,4</sup> | Kim C. Donaghue<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Paediatrics, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

<sup>2</sup>Institute of Endocrinology and Diabetes, The Children's Hospital at Westmead, Sydney, New South Wales, Australia

<sup>3</sup>NHMRC Clinical Trials Centre, Sydney, New South Wales, Australia

<sup>4</sup>The University of Sydney, Sydney, New South Wales, Australia

<sup>5</sup>University of New South Wales, Sydney, New South Wales, Australia

<sup>6</sup>Department of Respiratory Medicine, The Children Hospital at Westmead, Sydney, New South Wales, Australia

### Correspondence

Prof. Kim Donaghue, Institute of Endocrinology and Diabetes, The Children's Hospital at Westmead, Sydney, NSW 2145, Australia.  
Email: kim.donaghue@health.nsw.gov.au

### Funding information

Practitioner Fellowships to AJJ and MEC; Regional Diabetes Support Scheme Grant

### Abstract

**Background:** Inflammation is implicated in the pathogenesis of diabetes and its complications in adults. Little is known about the relative contribution of inflammation in common types of diabetes in youth: type 1 diabetes (T1D), type 2 diabetes (T2D), and cystic fibrosis-related diabetes (CFRD). This study investigates inflammatory markers by diabetes type and complication status, and assesses indicators of inflammation and complications.

**Methods:** A cross-sectional study of 134 T1D, 32 T2D, 32 CFRD and 48 subjects without diabetes (including 11 with CF and normal glucose tolerance) was undertaken. Inflammation was assessed by sE-selectin by ELISA, hsCRP by turbidimetry, WCC and ESR. Nephropathy was defined by albuminuria, autonomic neuropathy by heart rate variability, and peripheral neuropathy by vibration and thermal threshold testing and retinopathy by seven-field stereoscopic fundus photography. Descriptive statistics, parametric and non-parametric ANOVA and regression analyses were performed, with significance at  $P < .05$ .

**Results:** Of 198 diabetic participants; 49% female, mean (SD) age, median diabetes duration and median HbA1c were 16 (2.5) and 6 (3–9) years, and 8.1 (6.9–9.3)%, respectively. All inflammatory markers were lower in T1D than in other diabetes groups ( $P < .05$ ) but higher than in non-diabetic controls. T2D ( $n = 32$ ) and CFRD ( $n = 32$ ) subjects had comparable elevated levels of inflammation. Body mass index (BMI) was a strong independent explanatory variable of inflammation. In multivariate analysis, hsCRP and ESR were associated with complications in addition to HbA1c, BMI, and diastolic BP.

**Conclusions:** Circulating inflammatory markers are elevated in adolescents with diabetes, being higher and comparable in T2D and CFRD than in T1D. Inflammation is independently associated with diabetes complications, consistent with inflammation driving vascular pathology in diabetes.

### KEYWORDS

clinical research, cystic fibrosis-related diabetes, diabetes, inflammation, type 1 diabetes, type 2 diabetes, youth



## 1 | INTRODUCTION

Inflammation has been implicated in the pathogenesis of both diabetes mellitus<sup>1</sup> and its chronic complications in adults,<sup>2,3</sup> in particular with type 2 diabetes (T2D).<sup>4,5</sup> Similarly, obesity is a risk factor for T2D and is also associated with complications, including nephropathy<sup>6</sup> and retinopathy,<sup>7</sup> in adults with type 1 diabetes (T1D). The adiposity effect may be mediated by associated dyslipidemia, hypertension, and increased inflammation. Examining these risk factors in youth may clarify the interactions and will extend knowledge. In youth, there are several common types of diabetes: T1D, T2D, and cystic fibrosis-related diabetes (CFRD). The latter is usually associated with systemic and pulmonary inflammation due to infection, without obesity.<sup>8,9</sup>

Circulating inflammatory markers include white cell count (WCC), the erythrocyte sedimentation rate (ESR), and C-reactive protein (CRP), which is produced in many tissues, including adipocytes, the liver, and the vasculature.<sup>10</sup> WCC, ESR, and CRP assays are commonly available in clinical pathology laboratories, whilst other inflammatory markers (eg, vascular cell adhesion molecules (CAMs) are research tools requiring informed consent, ethics approvals, additional blood sample, and specialized assays. CRP levels are often correlated with body mass index (BMI); in particular, with adiposity<sup>11</sup> and with infections,<sup>10</sup> with CRP levels above 10 mg/L being likely due to concurrent infection.<sup>12</sup> CAMs, including sE-selectin, sVCAM-1 and sICAM, are expressed by arterial endothelial cells and are research markers of vascular inflammation. CAM levels often correlate with each other as they are part of a chain reaction of monocyte adhesion, rolling, and arterial wall ingress, in which they become macrophages, accumulate lipoproteins, including native and modified (eg, glycated and oxidized) low-density lipoprotein (LDL) and cause atherosclerosis.<sup>13</sup> Soluble forms of the CAMs are shed into the circulation, the levels of which have been associated with, and are predictive of, cardiovascular disease in adults in the general and diabetic population, as well as of the microvascular complications of T1D.<sup>14,15</sup>

As little is known about inflammation levels and the three common forms of diabetes in youth we conducted an observational cross-sectional study of children and adolescents with T1D, T2D, and CFRD to assess levels of inflammation and their relationships to diabetes type and chronic complications. We hypothesized that the level of inflammatory markers (a) is higher in all forms of diabetes compared to non-diabetic reference groups; (b) is associated with the complication status of diabetic patients independently of glycemic control and diabetes duration; and that (c) obesity in diabetic youth, reflected by higher BMI, is associated with increased levels of inflammatory markers.

## 2 | METHODS

This cross-sectional study was approved by the Human Research Ethics Committees at The Children's Hospital at Westmead (CHW) and the University of Sydney, and all participants and their families provided written informed consent. hsCRP and sE-selectin were measured in those with diabetes and in those without diabetes: Those

with diabetes underwent complications assessments with measurement of WCC and ESR and other laboratory tests. WCC and ESR measures were not performed in the non-diabetic reference groups and comparisons could only be made with standard reference values from CHW.

### 2.1 | Subjects

The study group was 198 youth with diabetes attending the CHW Sydney during 2011-17: (a) 134 adolescents with T1D diagnosed clinically and confirmed by low C-peptide levels and positive autoantibody status; (b) 32 adolescents with T2D diagnosed clinically with negative autoantibodies and without maturity onset diabetes of the young (MODY) or secondary diabetes mellitus; and (c) 32 adolescents with CFRD defined as a fasting blood glucose (BGL) >7 mmol/L or 2-hour BGL >11.1 mmol/L, in the most recent oral glucose tolerance test (OGTT) or hemoglobin A1c (HbA1c) >6.5% in association with cystic fibrosis (CF). Participants were recruited during their diabetes complications assessment service (DCAS) visit: after 2 years T1D when diagnosed  $\geq 11$  years or after 5 years duration when diagnosed <11 years old; T2D and CFRD at diagnosis. Eligibility criteria were stable disease, absence of severe hypoglycemia in the prior 6 months, without evident acute infection, and lack of oral corticosteroid treatment for at least 4 weeks. None of the included CF patients was treated with CF-channel drugs.

Two age- and gender-matched reference groups of 37 apparently healthy youth from families of hospital patients or staff members and 11 CF patients with normal glucose tolerance were recruited during 2011-17. First degree relatives of diabetes patients were eligible if they had negative diabetes antibodies, and were free from chronic inflammatory medical conditions, intercurrent fever or infection. CF patients without diabetes were eligible if they had no evident infection and were not taking oral corticosteroids for at least 4 weeks.

### 2.2 | Diabetes clinical and complications assessment

Height (Harpender stadiometer) and weight (electronic scales) were measured and BMI calculated (weight (kg)/height (m)<sup>2</sup>) and height, weight, and BMI SD scores (SDS) calculated according to the least means square (LMS) method.<sup>16</sup> Weight categories (underweight: <15th percentile; normal:  $\geq 15$ th percentile and  $\leq 85$ th percentile; overweight: >85th percentile and < 97th percentile; and obese:  $\geq 97$ th percentile) were as per World Health Organization (WHO) standards.<sup>17</sup> Blood pressure (BP) was measured by auscultation after 5 minutes (min.) rest in a seated position, with age and sex-related SDS for systolic BP (SBP) and diastolic BP (DBP) calculated according to established standards.<sup>18</sup> Hypertension was defined as BP levels  $\geq 95$ th percentile for age (<18 years),  $\geq 140/90$  mmHg ( $\geq 18$  years), or relevant medical therapy.

A non-fasting 10 mL blood sample was collected by venipuncture and a timed overnight urine sample collected. Approximately 8 mL blood and at least 5 mL of urine were sent to the central laboratory of

CHW for immediate analyses for non-fasting lipids, WCC and ESR and urinary albumin creatinine ratio (ACR).

### 2.2.1 | Diabetic nephropathy

Diabetic nephropathy was defined as microalbuminuria (either AER  $\geq 20$   $\mu\text{g}/\text{min}$  in at least two of three samples from timed overnight collections or mean ACR  $\geq 3.5$  (male)/ $\geq 4$  (female)  $\text{mg}/\text{mmol}$  from three first morning collections).

### 2.2.2 | Heart rate variability

Heart rate variability (HRV), a measure of cardiac autonomic function, was assessed as previously described,<sup>19</sup> using LabChart Pro (AD Instruments, Sydney, NSW, Australia), based on a 10 minutes continuous EKG (ectopics excluded) in rested supine patients. One operator visually scanned the trace for R-waves among artifacts and ectopic beats. Time-domain HRV measures included three different categories: baseline heart rate, the SD of the R-R interval (SDNN), and root mean squared difference of successive R-R intervals (RMSSD). Frequency domain measures included four further categories: low frequency (LF), defined as  $>0.04$  and  $<0.15$  Hz, considered as sympathetic component, and high frequency (HF) components, defined as  $>0.15$  and  $<0.4$  Hz, considered as parasympathetic component, and the LF:HF ratio, considered to be an estimation of the relative sympathetic and parasympathetic balance, as well as a triangular index.<sup>20</sup> Elevated heart rate and HRV abnormalities were defined as  $\geq 1$  abnormality in those seven categories based on  $\leq 5$  or  $\geq 95$ th percentiles in age- and sex-matched control subjects measured using the same equipment.

### 2.2.3 | Peripheral nerve function

Peripheral nerve function was measured by vibration threshold at the left malleolus and left great toe and thermal threshold function testing for hot and cold at the dorsum of the left foot (TSA; 2001 Neurosensory Analyzer Model TSA-II [Vibratory Sensory Analyzer; VSA-3000-Option]). Normal ranges based on reference data from non-diabetic controls, adjusted for age and gender and measurements outside the 95th percentile on  $\geq 1$  of these four tests were considered abnormal.

### 2.2.4 | Diabetic retinopathy

Diabetic retinopathy (DR) was determined from seven-field stereoscopic fundus photos (Topcon Fundus camera TRC 50-VT, Tokyo Optical Co., Tokyo) taken through (cyclopentolate 1% and phenylephrine 2.5%) dilated pupils and graded (modified Airlie House classification<sup>21</sup>) by a single ophthalmologist. DR was defined as presence of at least one microaneurysm or hemorrhage (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study [ETDRS Score] $\geq 21$ ). Retinopathy severity was based on the worse eye and categorized as none, minimal non-proliferative, mild to moderate non-proliferative, or proliferative DR.

### 2.2.5 | Laboratory measures

Blood was centrifuged (3000 rpm, 10 minutes,  $10^{\circ}\text{C}$ ) and plasma stored ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) until analysis for CRP by high sensitivity assay (hsCRP) and sE-selectin at the National Health and Medical Research Centre (NHMRC) Clinical Trial Centre (University of Sydney). CRP was measured by high-sensitivity turbidimetry (Roche, Diagnostics, Basel, Switzerland on a Cobas Integra 400+) and a sE-selectin by ELISA (R&D, Minneapolis, Minnesota) with intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) of less than 5% and 13%, respectively.

Blood for HbA1c, WCC, ESR, lipids, liver, and renal function and urine for albuminuria was analyzed in the CHW clinical laboratories. HbA1c was evaluated by high-performance liquid chromatography (Adams Arkray Inc., Kyoto, Japan). Lipid profiles and serum creatinine were assessed by routine laboratory methods and urinary ACR was measured with an Immulite 1000 immunoassay analyzer (Siemens, Los Angeles, California). Abnormal values were defined by Australian clinical guidelines.

### 2.2.6 | Statistics

Data were analyzed using SPSS version 24 (Armonk, USA). Statistical significance was taken at  $P < .05$ . Normal distribution of variables was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. Descriptive analyses calculated the mean  $\pm$  SD or median and interquartile range for continuous variables and the number and percentage for categorical variables. Differences between groups were analyzed using analysis of variance (ANOVA) (with Bonferroni post-hoc test) for normally distributed variables and Kruskal-Wallis ANOVA (with Mann-Whitney test) for non-normally distributed variables (with Bonferroni correction for multiple comparisons). For categorical variables  $\chi^2$  test was used.

Univariate and multivariate logistic regression were used to analyze associations between complication status and laboratory results. Microvascular complications were defined as presence of either microalbuminuria, peripheral nerve abnormalities or diabetic retinopathy. Statistically significant and clinically important explanatory variables were included in multivariate analysis models. Covariates examined were HbA1c, diabetes duration, and BMI, which are routinely available and widely accepted to influence the clinical outcome of diabetes.<sup>22-25</sup>

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Clinical characteristics

Demographics of the 192 study participants with diabetes are shown in Table 1. Mean age was 15.6 (SD 2.5) years and 49% were female (diabetes patients vs controls: 15.6 (SD 2.5) vs 14.0 (SD 2.7) years, 51% vs 42% girls). Adolescents with T1D were slightly older, had longer diabetes duration and higher HbA1c levels. Adolescents with T2D had higher BMI, more hypertension, and greater lipid abnormalities than those with T1D. Relative to the T1D group, adolescents with

**TABLE 1** Clinical characteristics for subjects according to diabetes type

	T1D (n = 134)	T2D (n = 32)	CFRD (n = 32)
Age (years)	15.8 [2.6]	15.1 [1.9]	14.6 [2.2] <sup>b</sup>
Diabetes duration (years)	8.1 [5.4-10.5] <sup>a</sup>	1.8 [0.3-3.3]	2.3 [1.0-3.9] <sup>b</sup>
BMI	22.7 [20.7-25.9] <sup>a</sup>	31.7 [27.5-35.2] <sup>c</sup>	18.5 [16.7-20.6] <sup>b</sup>
Weight category: Underweight/normal/overweight/obese (%)	2/57/30/11	0/3/22/75	19/78/3/0
HbA <sub>1c</sub> (%)	8.5 [7.7-9.5] <sup>a</sup>	6.6 [5.6-9.2]	5.9 [5.7-6.5] <sup>b</sup>
Hypertension	12/134 [9%]	6/31 [19%] <sup>c</sup>	0/28 [0%]
Any complications	87/134 [65%]	23/31 [72%]	18/28 [56%]
Microalbuminuria	1/123 [1%] <sup>a</sup>	6/20 [19%] <sup>c</sup>	0/19 [0%]
HRV abnormalities	35/126 [28%] <sup>a</sup>	14/26 [54%]	12/24 [50%] <sup>b</sup>
Elevated heart rate	12/126 [10%] <sup>a</sup>	9/26 [35%]	6/24 [25%] <sup>b</sup>
Peripheral nerve abnormalities	6/132 [5%]	6/31 [19%]	0/27 [0%]
Retinopathy	21/133 [16%]	2/30 [7%]	2/26 [8%]
Elevated liver enzymes	14/96 [15%]	7/26 [27%]	9/19 [47%] <sup>b</sup>
<i>Lipids</i>			
Abnormal lipid profile	19/134 [14%] <sup>a</sup>	15/31 [48%]	7/29 [24%]
Total cholesterol (mmol/L)	4.4 [3.8-4.9]	4.7 [4.1-5.2] <sup>c</sup>	3.2 [2.8-3.7] <sup>b</sup>
Triglycerides (mmol/L)	1.0 [0.7-1.4] <sup>a</sup>	1.6 [1.2-2.4]	1.4 [1.1-1.8] <sup>b</sup>
HDL-C (mmol/L)	1.4 [1.1-1.6] <sup>a</sup>	1.1 [0.8-1.3]	1.0 [0.8-1.3] <sup>b</sup>
LDL-C (mmol/L)	2.5 [2.0-2.9]	2.7 [2.1-3.4] <sup>c</sup>	1.6 [1.3-2.0] <sup>b</sup>

Note: Statistics reported like X[X-X] are medians [25th percentile-75th percentile], like X[X] are means[SD], all values marked with a superscript have significant P-values (<0.05) between the indicated diabetes groups in Bonferroni post-hoc test, Mann-Whitney test or  $2 \times 2 \chi^2$  test.

Abbreviations: BMI, body mass index; CFRD, cystic fibrosis-related diabetes; HRV, heart rate variability; T1D, type 1 diabetes; T2D, type 2 diabetes.

<sup>a</sup>T1D vs T2D.

<sup>b</sup>T1D vs CFRD.

<sup>c</sup>T2D vs CFRD.

CFRD had lower BMI and cholesterol levels, higher triglyceride levels and more abnormal liver function tests.

### 3.2 | Inflammatory markers

Inflammatory markers are shown in Figure 1. In healthy and CF subjects levels of hsCRP and sE-selectin (median [LQ-UQ]) were 0.4 (0.2-0.8) mg/L and 38.9 (27.4-60.4) ng/ml and 1.0 (0.1-1.6) mg/L and 58.0 (42.9-78.6) ng/ml respectively. The hsCRP and sE-selectin levels were significantly higher in T2D and CFRD groups than in the reference group: 2.3 (1.0-4.5) mg/L ( $P < .001$ ) and 62.6 (46.4-80.7) ng/ml ( $P = .005$ ) and 1.6 (0.5-5.0) mg/L ( $P = .003$ ) and 71.5 (48.5-115.8) ng/ml ( $P = .002$ ) respectively. There was no difference between hsCRP and sE-selectin levels between T1D and healthy subjects (0.5 (0.3-1.4) mg/L ( $P = .09$ ) and 42.1 (33.1-55.0) ng/ml ( $P = .68$ ), respectively).

Median WCC and ESR levels of T1D ( $6.3 (5.4-7.6) \times 10^9/L$  and  $7.0 (4.0-15.0)$  mm/h respectively) and T2D ( $8.8 (7.2-10.2) \times 10^9/L$  and  $13.0 (9.0-30.0)$  mm/h respectively) were within the accepted reference range (WCC for 5-10 years of age  $5.0-14.5 \times 10^9/L$ , for 10-15 years  $4.5-13.5 \times 10^9/L$ , for >15 years  $4.0-11.5 \times 10^9/L$ , ESR 0-20 mm/h, except males >15 years 0-15 mm/h). Levels of hsCRP and sE-selectin tended to be lower in the CF (non-diabetic) reference group compared to CFRD: 1.0 (0.1-1.6) vs 1.6 (0.5-5.0) mg/L ( $P = .08$ ), 58.0 (42.9-78.6) ng/ml vs 71.5

(48.5-115.8) ng/ml ( $P = .17$ ) respectively. As shown in Figure 1, relative to T1D subjects each inflammatory biomarker level was higher in T2D (hsCRP  $P < .001$ , sE-selectin  $P < .001$ , WCC  $P < .001$ , ESR  $P = .005$ ) and in CFRD (hsCRP  $P = .001$ , sE-selectin  $P < .001$ , WCC  $P = .02$ , ESR  $P = .01$ ).

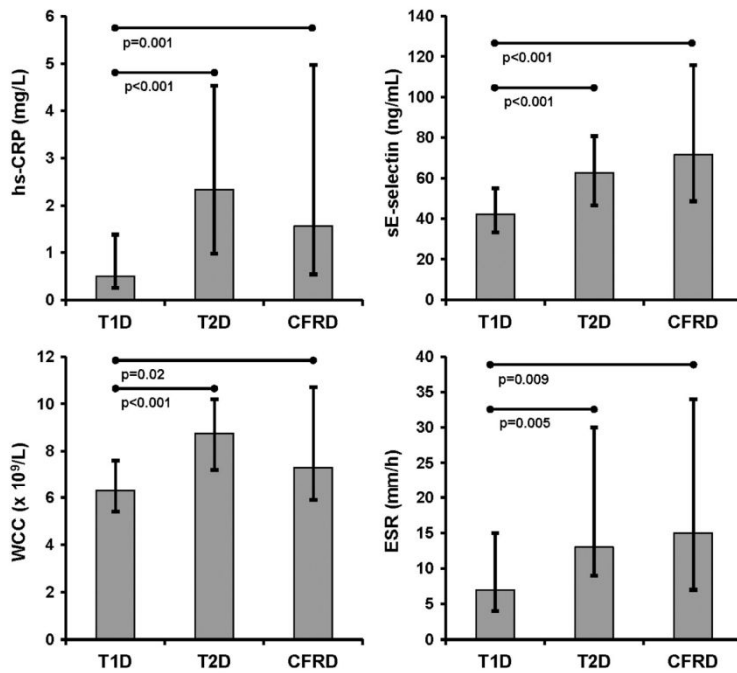
After adjusting for BMI, diabetes duration, and HbA<sub>1c</sub> the levels of inflammatory markers remain significantly higher in CFRD compared to T1D (Figure 2). We also observed significantly higher levels of biomarkers in CFRD compared to T2D (hsCRP  $P = .002$ , sE-selectin  $P = .002$ , ESR  $P = .003$ ).

hsCRP and ESR were significantly higher in subjects with diabetes complications vs those without: 0.9 (0.3-2.7) mg/L vs 0.5 (0.3-1.4) mg/L ( $P = .02$ ), and 10.0 (5.0-22.0) mm/h vs 7.0 (3.5-14.0) mm/h ( $P = .04$ ), respectively.

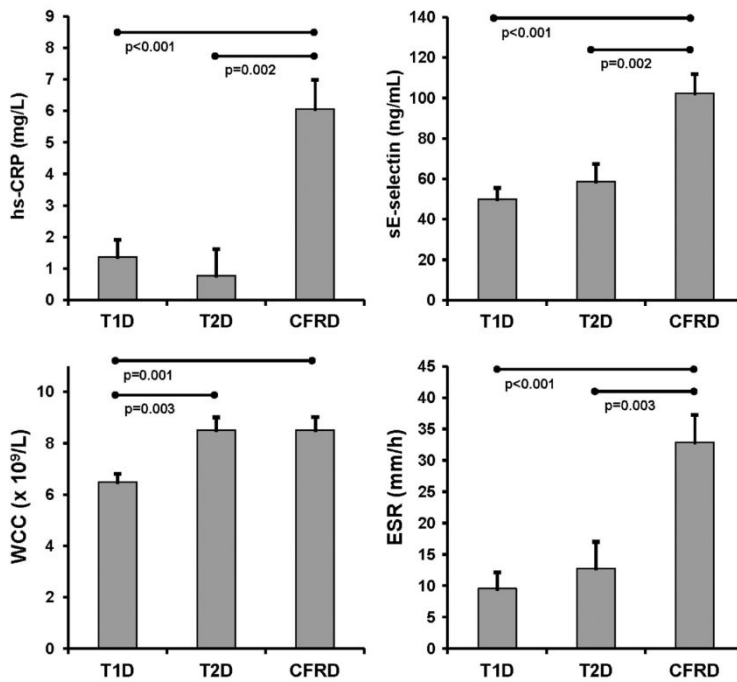
Six participants (2 with T1D, 1 with T2D, 2 with CFRD, and 1 healthy control) had hsCRP levels >10 mg/L. The frequency of higher CRP levels was not significantly different between groups and therefore these subjects were included in the analysis. The exclusion of those did not significantly change the results (Supporting Information).

### 3.3 | Complications status

T2D participants had the most chronic complications, followed by T1D and then CFRD patients, independently of diabetes duration.



**FIGURE 1** Unadjusted blood levels median (LQ, UQ) of inflammation markers by diabetes type



**FIGURE 2** Blood levels (mean ± SEM) of inflammation markers by diabetes type. Adjusted for diabetes duration, BMI and HbA1c

Albuminuria was most common in T2D (19% vs 1% vs 0%). The T1D group had less autonomic nerve abnormalities than the T2D or CFRD groups (28% vs 54% vs 50%) and less peripheral nerve abnormalities

than T2D (5% vs 19%). Retinopathy was most common in T1D (16% vs (T2D) 7% vs (CFRD) 8%), but these differences did not reach statistical significance.

**TABLE 2** Variables associated with diabetes complications

Complication	Explanatory variable	Univariate		Adjusted for age & gender		Multivariable model	
		OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value
Any complication (n = 192)	HbA1c	1.27 (1.06-1.51)	.01	1.28 (1.07-1.53)	.008	1.29 (1.07-1.55)	.008
	BMI	1.07 (1.01-1.14)	.02	1.08 (1.01-1.15)	.027	1.08 (1.01-1.15)	.03
	DBP	1.04 (1.01-1.08)	.02	1.04 (1.01-1.08)	.02		n.s.
	ESR	1.89 (1.09-3.27)	.02	2.02 (1.12-3.64)	.019	1.88 (1.02-3.44)	.04
Microvascular complications (43/121)	HbA1c	1.28 (1.07-1.53)	.008	1.27 (1.05-1.54)	.013	1.36 (1.11-1.67)	.004
	BMI	1.15 (1.07-1.23)	<.001	1.14 (1.06-1.22)	<.001	1.15 (1.06-1.24)	.001
	SBP	1.04 (1.01-1.07)	.007	1.04 (1.00-1.07)	.025		n.s.
	DBP	1.05 (1.01-1.09)	.01				
	ESR	1.91 (1.21-3.01)	.006	1.89 (1.15-3.09)	.012		n.s.
HRV abnormalities (n = 176)	BMI	1.07 (1.01-1.13)	.015	1.07 (1.01-1.13)	.02		n.s.
	SBP	1.05 (1.02-1.08)	<.001	1.06 (1.03-1.09)	<.001	1.05 (1.02-1.09)	<.001
	DBP	1.06 (1.02-1.10)	.001	1.06 (1.02-1.11)	.002	1.06 (1.01-1.10)	.009
	hsCRP	1.93 (1.12-3.33)	.019	1.88 (1.10-3.20)	.021	1.81 (1.04-3.16)	.037
	WCC	1.41 (1.00-1.97)	.049		n.s.		n.s.
	ESR	1.80 (1.15-2.83)	.01	1.70 (1.08-2.69)	.02	1.68 (1.08-2.64)	.02

Notes: Multivariable model: explanatory variable adjusted for age, gender + BMI, SBP/DBP, and HbA1c (if not yet explanatory variable). For ESR, CRP, WCC, and sE-selectin z-scores were used for logistic regression. Abbreviations: BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; DBP, diastolic BP; ESR, erythrocyte sedimentation rate; HRV, heart rate variability; SBP, systolic BP; WCC, white cell count.

### 3.4 | Relationships between diabetes complications and clinical characteristics including body habitus and inflammation

HbA1c, BMI, BP, and inflammatory markers were significantly associated with individual complication types (Table 2). The ESR level was associated independently with overall complication status, in addition to age, gender, HbA1c, BMI, and BP. In individual complication analyses hsCRP, WCC, and ESR were associated with HRV abnormalities. The ESR level was associated with complications in the group with retinopathy, peripheral nerve abnormalities, and albuminuria.

The rates of BMI categories in T1D, T2D, and CFRD are shown in Table 3. As expected, T2D was associated with the highest rate of obesity and CFRD was associated with the highest rates of being underweight. Of T1D youth, 40% were overweight or obese. Inflammation and diabetes complication status were explored in relation to BMI category (underweight, normal weight, overweight, obesity). Inflammatory markers differed by body habitus; in particular obese patients had higher levels of most inflammatory biomarkers relative to all other weight categories. Only the WCC was significantly higher in underweight patients. Also, overall in the diabetes groups a pattern of complications being more common with increasing BMI was noted. As there were relatively few underweight subjects they were also grouped with normal weight subjects, and the differences in hsCRP levels and prevalence of diabetes complications remained statistically significant.

## 4 | DISCUSSION

In this cross-sectional study of adolescents with T1D, T2D, and CFRD we found significant differences in levels of inflammatory biomarkers by diabetes type and by chronic complication status. Generally, inflammation levels were comparable in CRFD and T2D patients, with both being higher than in T1D. hsCRP and sE-selectin levels were numerically, but not statistically significantly, higher in all diabetes types relative to non-diabetic groups. Besides a high prevalence of chronic complications in T2D and CFRD we noted and explored strong associations between the presence of chronic complications and BMI and concurrent HbA1c levels. The observed link between the general complication status and BMI might be explained by or contributed to by higher levels of inflammatory markers and by increased complication prevalence in obese participants. To the best of our knowledge, this is the first study directly comparing inflammation biomarker levels in youth with T1D, T2D, and CFRD, the chronic diabetes complications and to assess the relationships of body weight with complications and inflammation levels.

Regarding chronic complications, while accepted, albeit early, evidence of retinal, renal, and neurologic complications was utilized, it was disconcerting to note their presence at a similar high prevalence (56%-72%) in all three groups of youth with diabetes. Retinopathy rates did not differ significantly between groups. Of particular concern, the known diabetes durations for the T2D and CFRD groups were quite short, at 1.8 and 2.3 years respectively, yet their chronic

**TABLE 3** Median of inflammation makers with interquartile range and prevalence of diabetes complications by weight categories

Outcome	Underweight (<15th percentile)	Normal ( $\geq$ 15th and $\leq$ 85th percentile)	Overweight (>85th and <97th percentile)	Obese ( $\geq$ 97th percentile)	P-value <sup>d</sup>
% of all diabetes patients	4	54	27	15	
T1D	2	59	32	8	
T2D	0	6	31	63	<.001*
CFRD	16	81	3	0	
hsCRP (mg/L)	0.12 [0.10-0.13]	0.44 [0.23-1.46]	1.04 [0.38-1.52]	2.94 [1.24-5.24] <sup>p</sup>	.001
sE-selectin (ng/ml)	44.0 [35.0-52.9]	47.6 [33.3-63.9]	43.4 [34.3-57.8]	51.5 [40.6-76.0]	.8
WCC ( $\times 10^9$ /L)	8.7 [6.5-14.0]	6.6 [5.4-7.7] <sup>b</sup>	6.5 [5.7-8.1] <sup>c</sup>	7.9 [5.5-9.7]	<.001
ESR (mm/h)	5 [3-14]	8 [4-16.8]	7 [3-15]	14.5 [8.3-29.8]	.6
Any complication	4/7 [57%]	63/104 [61%]	37/52 [71%]	23/29 [79%]	.2
Microalbuminuria	0/5 [0%]	1/90 [1%]	3/46 [7%]	3/20 [15%] <sup>e</sup>	.04
HRV abnormalities	3/7 [43%]	30/95 [32%]	13/47 [28%]	15/26 [58%]	.05
Peripheral nerve abnormalities	0/7 [0%]	3/103 [3%]	1/50 [2%]	8/29 [28%] <sup>q</sup>	<.001
Retinopathy	0/6 [0%]	13/102 [13%]	10/51 [20%]	2/29 [7%]	.3

Note: All individual P-values calculated with Bonferroni post-hoc test or  $\chi^2$  test.

\* comparison of proportions of T1D, T2D and CFRD patients in various weights categories.

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; CFRD, cystic fibrosis-related diabetes; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; HRV, heart rate variability; T1D, type 1 diabetes; T2D, type 2 diabetes; WCC, white cell count.

<sup>a</sup>Overweight vs obese:  $P = <.05$ .

<sup>b</sup>Underweight vs normal weight:  $P = <.05$ .

<sup>c</sup>Underweight vs overweight:  $P = <.05$ .

<sup>d</sup>One way ANOVA or  $4 \times 2 \chi^2$  test.

<sup>e</sup>Normal weight vs obese:  $P = <.05$ .

diabetes complication rates were as high as those with T1D, with a mean duration of 8.1 years. Unlike T1D, which presents acutely, it is possible that T2D and CFRD had been relatively asymptomatic and present for some years prior to their formal diagnosis. This emphasizes the importance of regular screening for diabetes in CF patients and in children and adolescents at risk for T2D. Recommended risk factors for screening for T2D in youth are obesity, a high-risk ethnic group, and a family history of T2D in the parents or grandparents.<sup>26</sup> We acknowledge a potential difference in our results may be caused by different diabetes duration between groups, but it is probable that with longer duration even more T2D and CFRD subjects may have developed chronic complications.

Neuropathy abnormalities, in particular HRV changes, were the most common type of diabetes complication in all three diabetes types. Yet, even though screening can be performed with a readily available EKG instrument, this test is not usually used in clinical practice. While retinopathy and peripheral nerve abnormalities rates were similar in all diabetes types, significantly higher rates of renal and neuropathic (microalbuminuria and HRV) abnormalities were found in T2D. Similar observations have been made previously,<sup>4</sup> though usually in older patients with and longer diabetes duration.<sup>5,27</sup> A study of complication prevalence in T1D and T2D patients of comparable age and diabetes duration to those in our study found higher rates of microalbuminuria, but similar rates of retinopathy in T1D and T2D participants, in spite of shorter diabetes duration and lower HbA1c

levels in those with T2D diabetes.<sup>4</sup> Likewise, retinopathy was infrequent in T2D and CFRD in our study group, even though a very sensitive detection method was used. Our participants with T1D with longer diabetes duration and higher HbA1c levels had higher rates of retinopathy, which is consistent with other earlier studies.<sup>28-31</sup> With respect to the prevalence of HRV changes and retinopathy in CFRD, we identified higher prevalence rates than in earlier studies,<sup>32,33</sup> and given their short known diabetes duration, this should raise awareness of the danger of underestimating the risk of long-term complications in CFRD. Although the incidences of certain complications were high in this study, the absolute numbers respectively were low in this young age group. Given the recognized associations between one microvascular diabetes complication and other microvascular complications, and between micro and macrovascular end-points, we used a composite endpoint for microvascular complications.<sup>34,35</sup>

Overall, relatively little is known about the long-term complication rates in CFRD, and to date few studies have investigated the prevalence of diabetes complications in CFRD with short disease duration. This is likely because the life expectancy of CF was previously much shorter than it is now, and CFRD patients often did not survive long enough to develop chronic diabetes complications. Given their increasingly long mean survival rate, now to 45 years,<sup>36</sup> attention to their diabetes and diabetes complication status and risk factor control is increasingly important. The relationship between abnormalities in glucose metabolism and mutation of the cystic fibrosis

transmembrane conductance regulator (CFTR) protein is not yet fully understood and the factors promoting chronic complications in CFRD are even less certain. We suggest that inflammation is one of these promoters. It is well-accepted that in CF, pancreatic biliary duct obstruction results in both exocrine and endocrine pancreatic dysfunction,<sup>37</sup> and there is also respiratory tract obstruction with epithelial destruction and proliferation of bacteria.<sup>38</sup> Hence, CF in general is characterized by chronic systemic and lung inflammation, even in the absence of pathogens.<sup>39,40</sup> With diabetes as a co-morbidity of CF, affecting 50% by the age of 30 years,<sup>41</sup> another state of vascular inflammation is added to this complex disease. In our study, we demonstrate similar levels of systemic inflammatory markers in CFRD as in T2D, which may provide an alarming signal that the risk for long-term complications in CFRD is also elevated compared to in T1D, and therefore underestimated and undertreated.<sup>32</sup> Future investigations, including more general and vascular-specific inflammation markers (eg, sVCAM-1, sICAM-1, and interleukin-8<sup>8,42</sup>), could increase our insight into inflammation in CFRD. Nevertheless, sE-selectin levels, which arise from arterial endothelial cells and reflect vascular inflammation, were highest in the CFRD group, being significantly higher than in the T1D group. We demonstrated similarly elevated sE-selectin levels in both the non-diabetic and diabetic CF patients, suggesting that endothelial dysfunction can occur in CF even in the absence of diabetes. CRP has many vascular and non-vascular tissues of origin, and the American Heart Association guideline on the assessment of cardiovascular risk<sup>43</sup> recommends that levels <1, 1-2, 2-3, and >3 mg/L represent normal, low, medium, high and very high CVD risk. Levels over 10 mg/L are often taken to reflect acute infection.<sup>12</sup> Even in our young T2D study group hsCRP levels were high, consistent with moderate CVD risk. hsCRP levels in CFRD were not far below those in T2D, and were even higher when adjusted for covariates reflecting very high CVD risk, hence the inflammation-related CVD risk in CFRD should not be underrated.<sup>44</sup> Although levels of all inflammatory markers were numerically lower in the healthy reference group compared to all the other study groups, the results were not statistically significant, which may relate to study size.

Concerning clinically available biomarkers for early chronic diabetes complications, our study found higher ESR levels were significantly associated with higher rates of complications. In particular, HRV abnormalities were associated with higher ESR, WCC, and hsCRP levels. While associations have previously been reported for hsCRP,<sup>45,46</sup> associations for WCC and ESR have not previously been reported.

Our findings of higher systemic and vascular inflammation markers in youth with T2D and CFRD with vs without complications, and a trend toward higher levels than in reference groups support an association between inflammation and the pathogenesis of chronic diabetes complications, as has been proposed for retinopathy,<sup>47</sup> nephropathy,<sup>48</sup> and atherosclerosis, and as our results also suggest, for autonomic neuropathy. With further exploration, these inflammatory markers may be useful prognostic markers at the individual level for complication screening and monitoring, perhaps as part of risk equations. Our results also support the potential of anti-inflammatory drugs being used to prevent or treat

diabetes complications. The use of anti-inflammatory drugs such as salicylate in diabetes has not only reduced the levels of markers of inflammation but also improved glucose metabolism.<sup>49</sup> Statins and ACE inhibitors, which are used to prevent vascular damage, can also reduce inflammatory markers.<sup>50,51</sup>

Reflecting the general population, many of the youth with diabetes in our study were overweight or obese, with only 54% being of normal weight. A normal BMI was most prevalent in the CFRD group, and 16% of the CFRD were underweight. In spite of the youth of our study subjects, we found that an elevated BMI was associated with higher inflammatory marker levels and chronic diabetes complications. Others have observed these phenomena,<sup>22,52</sup> especially obesity, peripheral nerve abnormalities, and microalbuminuria in older patients with T1D and T2D.<sup>53,54</sup> Elevated hsCRP levels have previously been reported in young obese T2D patients compared to obese non-diabetic controls.<sup>52</sup> Consequently, reducing central adiposity should be a therapeutic target not only in young T2D patients, but also in T1D and (if relevant) CFRD patients.

In contrast to the other inflammatory markers, WCC showed an inverse relationship with BMI, being significantly higher in underweight patients. As most underweight subjects were in the CFRD group, this may reflect current and recurrent infections, which may also contribute to their low body weight. Other studies with healthy adolescents not including CFRD patients have demonstrated the expected positive correlation between WCC and BMI.<sup>55,56</sup>

Females have been shown to have higher complication rates in youth with T1D.<sup>57-59</sup> In our statistical analyses, gender was not associated with any significant differences in complication status or in inflammatory marker levels. Previous studies have shown generally higher levels of inflammation in females, related to higher levels of body fat.<sup>60-62</sup>

Study strengths were the assessment of three types of diabetes in youth, which have never been compared in this way before. Furthermore, we evaluated childhood/adolescent groups with few co-morbidities, limited smoking history or use of anti-inflammatory medications, and had access to a detailed clinical characterization of each participant, in particular of their complication status. Recent severe hypoglycemia was a criteria for study exclusion, and we also expect that hypoglycemia would have been most likely in insulin treated subjects, hence in the T1D group, which tended to have lower inflammation levels than our T2D and CFRD groups.

Additionally, multiple inflammation markers were measured, most of which are routinely available in clinical laboratories, which enhances the potential for study replication and transfer into clinical practice. Our study was limited by its cross-sectional nature with measures of inflammation at a single time-point, the absence of non-diabetic groups with all biomarkers assessed and the lack of diabetic subject numbers to allow analyses related to specific individual complications. Other measures, such as of vascular function (sVCAM-1, sICAM and vascular reactivity), and other novel vascular risk markers (eg, oxidative stress, microRNAs) are of interest. Larger groups would provide greater statistical power.

In conclusion, in a cross-sectional study of children and adolescents with T1D, T2D, or CFRD, and non-diabetic reference groups, elevated markers of systemic and vascular inflammation were evident, and similar in T2D and CFRD. High rates of early chronic complications were present and related to BMI, HbA1c, and BP. Elevated BMI was common, and was associated with elevated inflammatory biomarkers and complication status. Early screening for T2D and CRFD in at-risk groups and for complications in all youth related diabetes is merited. Inflammation may be both a cause and effect of diabetes and its complications, and is a potential therapeutic target. Larger and longitudinal studies and intervention studies of anti-inflammatory agents are of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank study participants and the clinical and administration staff at CHW. A. J. J. is supported by a NHMRC Practitioner Fellowship and is a Sydney Medical School Foundation Fellow. M. E. C. is supported by a NHMRC Practitioner Fellowship.

#### ORCID

Maria E. Craig  <https://orcid.org/0000-0001-6004-576X>

#### REFERENCES

1. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116:1793-1801.
2. Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:3171-3182.
3. Domingueti CP, Dusse LM, Carvalho M, de Sousa LP, Gomes KB, Fernandes AP. Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *J Diabetes Complications*. 2016;30:738-745.
4. Eppens MC, Craig ME, Cusumano J, et al. Prevalence of diabetes complications in adolescents with type 2 compared with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29:1300-1306.
5. Song SH. Complication characteristics between young-onset type 2 versus type 1 diabetes in a UK population. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2015;3:e000044.
6. Sibley SD, Thomas W, de Boer I, Brunzell JD, Steffes MW. Gender and elevated albumin excretion in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications (DCCT/EDIC) cohort: role of central obesity. *Am J Kidney Dis*. 2006;47:223-232.
7. Price SA, Gorelik A, Furlan S, Colman PG, Wentworth JM. Obesity is associated with retinopathy and macrovascular disease in type 1 diabetes. *Obes Res Clin Pract*. 2014;8:e178-e182.
8. Chmiel JF, Berger M, Konstan MW. The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2002;23:5-27.
9. Chmiel JF, Davis PB. State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir Res*. 2003;4:8.
10. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*. 2003;111:1805-1812.
11. Choi J, Joseph L, Pilote L. Obesity and C-reactive protein in various populations: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2013;14:232-244.
12. Huizen J. What does it mean if you have a high C-reactive protein? *Medical News Today*; 2018.
13. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, et al. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*. 1995;91:2488-2496.
14. Lopes-Virella MF, Baker NL, Hunt KJ, Cleary PA, Klein R, Virella G. Baseline markers of inflammation are associated with progression to macroalbuminuria in type 1 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2013;36:2317-2323.
15. Rajab HA, Baker NL, Hunt KJ, et al. The predictive role of markers of inflammation and endothelial dysfunction on the course of diabetic retinopathy in type 1 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2015;29:108-114.
16. Pan H, Cole TJ. *User's guide to Imschartmaker*. London, England: UK Medical Research Council; 2005.
17. WHO, Multicentre, Growth, Reference, Study, Group. *WHO Child Growth Standards: Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age: Methods and development*. Geneva: World Health Organization; 2006:312.
18. Report of the Second Task Force on Blood Pressure Control in Children—1987. Task Force on Blood Pressure Control in Children. National Heart, Lung, and Blood Institute, Bethesda, Maryland. *Pediatrics*. 1987;79:1-25.
19. Cho YH, Craig ME, Jopling T, Chan A, Donaghue KC. Higher body mass index predicts cardiac autonomic dysfunction: a longitudinal study in adolescent type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2018;19:794-800.
20. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation*. 1996;93:1043-1065.
21. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. IV Diabetic Macular Edema. *Ophthalmology*. 1984;91:1464-1474.
22. Gray N, Picone G, Sloan F, Yashkin A. Relation between BMI and diabetes mellitus and its complications among US older adults. *South Med J*. 2015;108:29-36.
23. Shamshegiran SM, Mamaghanian A, Aliasgarzadeh A, Aiminisani N, Iranparvar-Alamdari M, Ataie J. Age differences in diabetes-related complications and glycemic control. *BMC Endocr Disord*. 2017;17:25.
24. Maric-Bilkan C. Sex differences in micro- and macro-vascular complications of diabetes mellitus. *Clin Sci*. 2017;131:833-846.
25. Dost A, Bechtold-Dalla Pozza S, Bollow E, et al. Blood pressure regulation determined by ambulatory blood pressure profiles in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: impact on diabetic complications. *Pediatr Diabetes*. 2017;18:874-882.
26. Shaw J. Epidemiology of childhood type 2 diabetes and obesity. *Pediatr Diabetes*. 2007;8(Suppl 9):7-15.
27. Constantino MI, Molyneaux L, Limacher-Gisler F, et al. Long-term complications and mortality in young-onset diabetes: type 2 diabetes is more hazardous and lethal than type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36:3863-3869.
28. Mayer-Davis EJ, Davis C, Saadine J, et al. Diabetic retinopathy in the SEARCH for diabetes in youth cohort: a pilot study. *Diabetic Med*. 2012;29:1148-1152.
29. Maguire A, Chan A, Cusumano J, et al. The case for biennial retinopathy screening in children and adolescents. *Diabetes Care*. 2005;28:509-513.
30. Yung B, Landers A, Mathalone B, Gyi KM, Hodson ME. Diabetic retinopathy in adult patients with cystic fibrosis-related diabetes. *Respir Med*. 1998;92:871-872.



31. Farah SE, Wals KT, Friedman IB, Pisacano MA, DiMartino-Nardi J. Prevalence of retinopathy and microalbuminuria in pediatric type 2 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2006;19:937-942.
32. Schwarzenberg SJ, Thomas W, Olsen TW, et al. Microvascular complications in cystic fibrosis-related diabetes. *Diabetes Care.* 2007;30:1056-1061.
33. van den Berg JM, Morton AM, Kok SW, Pijl H, Conway SP, Heijerman HG. Microvascular complications in patients with cystic fibrosis-related diabetes (CFRD). *J Cystic Fibrosis.* 2008;7:515-519.
34. Grunwald JE, Pistilli M, Ying GS, et al. Retinopathy and the risk of cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease (from the chronic renal insufficiency cohort study). *Am J Cardiol.* 2015;116:1527-1533.
35. Karlberg C, Falk C, Green A, Sjolie AK, Grauslund J. Proliferative retinopathy predicts nephropathy: a 25-year follow-up study of type 1 diabetic patients. *Acta Diabetol.* 2012;49:263-268.
36. Foundation CF. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. 2015 Annual Data Report. Bethesda, Maryland: Cystic Fibrosis Foundation; 2016.
37. Lohr M, Goertchen P, Nizze H, et al. Cystic fibrosis associated islet changes may provide a basis for diabetes. An immunocytochemical and morphometrical study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1989;414:179-185.
38. Rottner M, Tual-Chalot S, Mostefai HA, Andriantsitohaina R, Freyssinet JM, Martinez MC. Increased oxidative stress induces apoptosis in human cystic fibrosis cells. *PLoS One.* 2011;6:e24880.
39. Conese M, Copreni E, Di Gioia S, De Rinaldis P, Fumarulo R. Neutrophil recruitment and airway epithelial cell involvement in chronic cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros.* 2003;2:129-135.
40. Courtney JM, Dunbar KE, McDowell A, et al. Clinical outcome of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis adults. *J Cyst Fibros.* 2004;3:93-98.
41. Andersen HU, Lannig S, Pressler T, Laugesen CS, Mathiesen ER. Cystic fibrosis-related diabetes: the presence of microvascular diabetes complications. *Diabetes Care.* 2006;29:2660-2663.
42. Bergin DA, Hurley K, Mehta A, et al. Airway inflammatory markers in individuals with cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *J Inflamm Res.* 2013;6:1-11.
43. Goff DC Jr, Lloyd-Jones DM, Bennett G, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63:2935-2959.
44. O'Shea D, O'Connell J. Cystic fibrosis related diabetes. *Curr Diab Rep.* 2014;14:511.
45. Anan F, Takahashi N, Nakagawa M, Ooie T, Saikawa T, Yoshimatsu H. High-sensitivity C-reactive protein is associated with insulin resistance and cardiovascular autonomic dysfunction in type 2 diabetic patients. *Metabolism.* 2005;54:552-558.
46. Muni RH, Kohly RP, Lee EQ, Manson JE, Semba RD, Schaumberg DA. Prospective study of inflammatory biomarkers and risk of diabetic retinopathy in the diabetes control and complications trial. *JAMA Ophthalmol.* 2013;131:514-521.
47. Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK, et al. Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes.* 2006;55:2401-2411.
48. Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci.* 2013;124:139-152.
49. Fleischman A, Shoelson SE, Bernier R, Goldfine AB. Salsalate improves glycemia and inflammatory parameters in obese young adults. *Diabetes Care.* 2008;31:289-294.
50. Jialal I, Miguelino E, Griffen SC, Devaraj S. Concomitant reduction of low-density lipoprotein-cholesterol and biomarkers of inflammation with low-dose simvastatin therapy in patients with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:3136-3140.
51. Fliser D, Buchholz K, Haller H. Antiinflammatory effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade in hypertensive patients with microinflammation. *Circulation.* 2004;110:1103-1107.
52. Reinehr T, Karges B, Meissner T, et al. Inflammatory markers in obese adolescents with type 2 diabetes and their relationship to Hepatokines and Adipokines. *J Pediatr.* 2016;173:131-135.
53. Smith AG, Singleton JR. Obesity and hyperlipidemia are risk factors for early diabetic neuropathy. *J Diabetes Complications.* 2013;27:436-442.
54. de Boer IH, Sibley SD, Kestenbaum B, et al. Central obesity, incident microalbuminuria, and change in creatinine clearance in the epidemiology of diabetes interventions and complications study. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:235-243.
55. Oliveira TM, de Faria FR, de Faria ER, Pereira PF, Franceschini SC, Priore SE. Nutritional status, metabolic changes and white blood cells in adolescents. *Rev Paul Pediatr.* 2014;32:351-359.
56. Perez-de-Heredia F, Gomez-Martinez S, Diaz LE, et al. Influence of sex, age, pubertal maturation and body mass index on circulating white blood cell counts in healthy European adolescents-the HELENA study. *Eur J Pediatr.* 2015;174:999-1014.
57. Monti MC, Lonsdale JT, Montomoli C, Montrouss R, Schlag E, Greenberg DA. Familial risk factors for microvascular complications and differential male-female risk in a large cohort of American families with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:4650-4655.
58. Cho YH, Craig ME, Donaghue KC. Puberty as an accelerator for diabetes complications. *Pediatr Diabetes.* 2014;15:18-26.
59. Zoffmann V, Vistisen D, Due-Christensen M. A cross-sectional study of glycaemic control, complications and psychosocial functioning among 18- to 35-year-old adults with type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2014;31:493-499.
60. Cartier A, Cote M, Lemieux I, et al. Sex differences in inflammatory markers: what is the contribution of visceral adiposity? *Am J Clin Nutr.* 2009;89:1307-1314.
61. Thorand B, Baumert J, Doring A, et al. Sex differences in the relation of body composition to markers of inflammation. *Atherosclerosis.* 2006;184:216-224.
62. Connelly PW, Hanley AJ, Harris SB, Hegele RA, Zinman B. Relation of waist circumference and glycemic status to C-reactive protein in the Sandy Lake Oji-Cree. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27:347-354.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Aulich J, Cho YH, Januszewski AS, et al. Associations between circulating inflammatory markers, diabetes type and complications in youth. *Pediatr Diabetes.* 2019;20:1118-1127. <https://doi.org/10.1111/pedi.12913>

## **6. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.





## 7. Publikationsliste

Publikation 1: Juliane Aulich, Yoon Hi Cho, Andrzej S Januszewski, Maria E Craig, Hiran Selvadurai, Susanna Wiegand, Alicia J Jenkins, Kim C Donaghue: **Associations between circulating inflammatory markers, diabetes type and complications in youth**, Pediatric Diabetes, [Dezember 2019]

## 8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung meiner Dissertation geholfen haben.

In erster Linie gilt mein Dank meiner australischen Betreuerin Prof. Kim Donaghue, die mich in meinem Vorhaben, ein Forschungsprojekt in Australien durchzuführen, von Anfang an unterstützt und ermutigt hat. Ihr Engagement, ihre Offenheit gegenüber dem Projekt und natürlich ihre außerordentliche fachliche Expertise haben dieses aufregende Vorhaben zu einem Erfolg werden lassen. Sie stellte dieses spannende Thema samt der Studienpopulation zur Verfügung und hieß mich herzlichst in ihrem Team in Sydney willkommen. Mit Rat und Tat stand sie mir ständig bei und stellte mir sämtliche Ressourcen für die Durchführung zur Verfügung. Auch nach meiner Rückkehr nach Deutschland war ein reger Austausch weiter möglich und so gelang es uns, die Arbeit trotz einer großen räumlichen Distanz zu komplettieren.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei meiner Doktormutter PD Dr. Susanna Wiegand bedanken, die so freundlich war, mein Vorhaben ebenfalls zu unterstützen und mir eine gute, zuverlässige Betreuerin in Berlin war. Ich bedanke mich für die konstruktiven Anmerkungen in der Endphase dieser Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Alicia Jenkins, die in ihrem Labor die notwendigen Materialien zur Verfügung stellte, sodass ich die laborchemischen Untersuchungen durchführen konnte. Sie inspirierte mich zum Nachdenken und beleuchtete stets andere Seiten der Thematik. Durch sie wurde mir ein sehr freundliches Arbeitsumfeld geboten. Eine großartige Anleitung und Betreuung im Labor wurde mir durch Andrzej Januszewski teil, der mir sowohl in den praktischen Durchführungen als auch bei der statistischen Auswertung eine unglaubliche Hilfe war und nie die Geduld mit mir verlor. Auch von Deutschland aus stand er mir telefonisch jeder Zeit zur Seite. Ohne seine Unterstützung wäre das Projekt weniger erfolgreich gewesen und ich bedanke mich für die effektive Zusammenarbeit.

Thematisch und organisatorisch war mir Dr. Yoon Hi Cho im CHW eine große Hilfe und ich bin sehr dankbar für ihre tatkräftige Unterstützung. Ein Großteil der Patienten hatte sie bereits vor meiner Ankunft in Sydney rekrutiert und somit bereits das Fundament für die Studie gelegt.

Für eine moralische sowie finanzielle Unterstützung meines Auslandsaufenthalts sowie meines Studiums möchte ich mich bei meinen Eltern, Antje und Ralf Aulich, bedanken, die mich stets in meinen Vorhaben und Ideen unterstützt haben und denen ich schlussendlich diese einmalige Möglichkeit zu verdanken habe. Sie gaben mir die Zeit und die Kraft, die ich für dieses Projekt brauchte.