

Povezanost plazmatskih koncentracija kemokina s metaboličkim komplikacijama šećerne bolesti tipa 1 i pretilosti u djece

Špehar Uroić, Anita

Doctoral thesis / Disertacija

2025

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:733915>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-27**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Anita Špehar Uroić

**Povezanost plazmatskih koncentracija
kemokina s metaboličkim
komplikacijama šećerne bolesti tipa 1
i pretilosti u djece**

DISERTACIJA



Zagreb, 2025.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Anita Špehar Uroić

**Povezanost plazmatskih koncentracija
kemokina s metaboličkim
komplikacijama šećerne bolesti tipa 1
i pretilosti u djece**

DISERTACIJA

Zagreb, 2025.

Disertacija je izrađena u Klinici za pedijatriju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb te u Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga i Zavodu za fiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Danka Grčević

Željela bih zahvaliti svima koji su pomogli u nastanku ove doktorske disertacije. Na prvome mjestu, zahvalnost dugujem svojoj mentorici, profesorici Danki Grčević. Zahvaljujem joj na potpori, strpljenju i podučavanju tijekom cijelog procesa izrade rada. U njezinom znanstvenom promišljanju, profesionalnosti, integritetu i čovječnosti našla sam uzor i inspiraciju za daljnji rad.

Zahvaljujem osoblju Klinike za pedijatriju, KBC Zagreb, prvenstveno svojoj bivšoj šefici Neveni te sestrama Biserki, Jasni i Marini koje su pomogle u prikupljanju ispitanika i uzimanju uzoraka te zaposlenicima Laboratorija za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga koji su pomogli u njihovoj obradi i analizi. Hvala Maši Filipović, Nataši Kovačić, Alanu Šućuru, Tomislavu Kelavi i Katerini Zrinski Petrović.

Zahvaljujem svojim prijateljicama i prijateljima, mojem „Konziliju“. Na ovom dugom putu bili ste mi potpora, rame za plakanje, smijeh i radost.

Na kraju, od srca zahvaljujem svojoj obitelji, Uroićima i Špeharima. Bez njihove pomoći, podrške, strpljenja i ljubavi svi propušteni zajednički trenutci bili bi još teži. Hvala mojoj Karlici na ilustracijama.

Rad posvećujem svojim roditeljima

SADRŽAJ:

1. UVOD I SVRHA RADA	1
1.1. Šećerna bolest tipa 1	2
1.2. Pretilost	5
1.3. Krvožilne promjene u djece sa šećernom bolešću tipa 1 i u pretile djece	7
1.3.1. Čimbenici rizika za razvoj ateroskleroze.....	7
1.3.2. Patofiziologija ateroskleroze	7
1.3.3. Razvoj ateroskleroze u rizičnim skupinama djece	10
1.3.4. Uloga upale kao glavnog čimbenika rizika za razvoj krvožilnih komplikacija.....	11
1.3.5. Patofiziologija razvoja upale osoba sa šećernom bolešću tipa 1 i u pretilih osoba	11
1.4. Kemokini i kemokinski receptori	15
1.4.1. Kemokini u razvoju šećerne bolesti tipa 1.....	17
1.4.2. Kemokini i pretilost.....	18
1.4.3. Kemokini i krvožilne komplikacije.....	19
1.5. Svrha istraživanja	21
2. HIPOTEZA	23
3. CILJEVI RADA	24
3.1. Opći cilj	24
3.2. Specifični ciljevi	24
4. ISPITANICI I METODE	25
4.1. Ispitanici	25
4.2. Metode	27
4.2.1. Klinički postupci	27
4.2.2. Laboratorijski postupci	27
4.2.2.1. Izolacija plazme i mononuklearnih stanica periferne krvi	28
4.2.2.2. Određivanje koncentracije kemokina pomoću mikrokuglica obloženih protutijelima	29
4.2.2.3. Određivanje koncentracije kemokina metodom ELISA	31
4.2.2.4. Imunofenotipizacija mononuklearnih stanica periferne krvi i određivanje izražaja kemokinskih receptora	31
4.3. Statistička analiza	34
5. REZULTATI	35
5.1. Osnovni demografski podatci ispitanika	35
5.2. Metabolički parametri u djece sa šećernom bolešću tipa 1, u pretile djece i u zdravih ispitanika	36
5.2.1. Povezanost odabranih demografskih, antropometrijskih i kardiometaboličkih parametara.....	40
5.3. Upalni biljezi u djece sa šećernom bolešću tipa 1, u pretile djece i u zdravih ispitanika	45
5.4. Fenotip mononuklearnih stanica periferne krvi u djece sa šećernom bolešću tipa 1, u pretile djece i u zdravih ispitanika	48

5.5.	Koncentracija kemokina u djece i adolescenata sa šećernom bolešću tipa 1, u pretile djece i u zdravih ispitanika	49
5.6.	Izražaj kemokinskih receptora na imunosnim populacijama mononuklearnih stanica periferne krvi	51
5.6.1.	Izražaj kemokinskih receptora u djece sa šećernom bolešću tipa 1	51
5.6.2.	Izražaj kemokinskih receptora u pretile djece.....	54
5.7.	Korelacije kemokina i izražavanja ispitivanih kemokinskih receptora na populacijama mononuklearnih stanica s upalnim i metaboličkim parametrima specifične za bolest	54
5.7.1.	Povezanost profila kemokina i kemokinskih receptora s kardiometaboličkim čimbenicima rizika u šećernoj bolesti	55
5.7.2.	Povezanost profila kemokina i kemokinskih receptora s kardiometaboličkim čimbenicima rizika u pretilosti	57
6.	RASPRAVA	60
6.1.	Kardiometabolički čimbenici rizika u djece sa šećernom bolešću tipa 1, pretile djece i zdravih ispitanika	60
6.1.1.	Dislipidemija	61
6.1.2.	Inzulinska rezistencija	63
6.1.3.	Hipertenzija.....	65
6.2.	Upalni parametri u djece sa šećernom bolešću tipa 1, pretile djece i zdravih ispitanika	66
6.2.1.	C-reaktivni protein.....	67
6.2.2.	Fibrinogen	70
6.3.	Kemokini i kemokinski receptori u djece sa šećernom bolešću tipa 1 i u pretile djece	71
6.3.1.	Imunosne populacije	72
6.3.2.	Kemokini i kemokinski receptori	73
6.4.	Ograničenja studije i mogući značaj za dizajniranje terapijskih intervencija	79
7.	ZAKLJUČCI	82
8.	SAŽETAK	84
9.	SUMMARY	85
10.	LITERATURA	86
11.	ŽIVOTOPIS	104

POPIS OZNAKA I KRATICA

ADA	Američko dijabetološko društvo, prema engl. <i>American Diabetes Association</i>
AGE	krajnji produkti glikacije, prema engl. <i>advanced glycation endproducts</i>
AHA	Američko udruženje za bolesti srca, prema engl. <i>American Heart Association</i>
ALT	alanin aminotransferaza
APC	alofikocijanin, prema engl. <i>allophycocyanin</i>
AST	aspartat aminotransferaza
ATM	makrofazi u masnom tkivu, prema engl. <i>adipose tissue macrophages</i>
CCL	kemokinski ligand s C – C motivom, prema engl. <i>C – C motif ligand</i>
CCR	receptor za kemokinski ligand s C – C motivom, prema engl. <i>C – C motif receptor</i>
CD	stanični biljeg, prema engl. <i>cluster of differentiation</i>
CDC	Centri za kontrolu bolesti i prevenciju (Sjedinjenih Američkih Država), prema engl. <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> ,
cIMT	debljina sloja intima-medija stijenke karotidne arterije, prema engl. <i>carotid intima-media thickness</i>
COSI	sustav koordiniranog praćenja (europske podružnice Svjetske zdravstvene organizacije), prema engl. <i>(WHO/Europe) coordinated surveillance system</i>
CRP	C-reaktivni protein
CXCL	kemokinski ligand s C – X – C motivom, prema engl. <i>C – X – C motif ligand</i>
CXCR	receptor za kemokinski ligand s C – X – C motivom, prema engl. <i>C – X – C motif receptor</i>
DKT	dijastolički krvni tlak
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina, prema engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	kolorimetrijski imunoenzimski postupak, prema engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELR kemokini	CXC-kemokini koji uz N-terminalni cisteinski ostatak sadrže motiv glutaminska kiselina – leucin – arginin (ELR motiv)
FGF	čimbenik rasta fibroblasta, prema engl. <i>fibroblast growth factor</i>

GAD	glutamička kisela dekarboksilaza, prema engl. <i>glutamic acid decarboxylase</i>
GUK	glukoza u krvi natašte
HbA1c	glikirani hemoglobin, hemoglobin A1c
HDL	lipoprotein visoke gustoće, prema engl. <i>high-density lipoprotein</i>
HDL-K	HDL-kolesterol, kolesterol u lipoproteinima visoke gustoće, prema engl. <i>high-density lipoprotein</i>
HOMA IR	indeks inzulinske rezistencije, prema engl. <i>homeostatic model assessment for insulin resistance</i>
IA-2	tirozin fosfataza – antigen otočića 2, prema engl. <i>tyrosine phosphatase-related islet antigen 2</i>
ICA	stanice otočića gušterače, prema engl. <i>islet cell antibodies</i>
ICAM-1	intracelularne adhezijske molekule-1, prema engl. <i>intercellular adhesion molecule</i>
IGF	čimbenik rasta sličan inzulinu, prema engl. <i>insulin-like growth factor</i>
IL	interleukin
INF	interferon
INS	inzulin
IQR	interkvartilni raspon
ISPAD	Međunarodno udruženje za pedijatrijsku i adolescentnu dijabetologiju, prema eng. <i>International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes</i>
ITM	indeks tjelesne mase
ITM-SDS	indeks tjelesne mase izražen kao vrijednost standardne devijacije
KBC Zagreb	Klinički bolnički centar Zagreb
LDL	lipoprotein niske gustoće, prema engl. <i>low-density lipoprotein</i>
LDL-K	LDL-kolesterol, kolesterol u lipoproteinima niske gustoće, prema engl. <i>low-density lipoprotein</i>
MAPKs	protein-kinaze aktivirane mitogenom, prema engl. <i>mitogen-activated protein kinases</i>
MIF	čimbenik inhibicije migracije makrofaga, prema engl. <i>macrophage migration inhibitory factors</i>
NADPH-oksida	nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat oksidaza, prema engl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase</i>
NF-κB	jezgrin čimbenik kapa B, prema engl. <i>nuclear factor kappa B</i>

NHANES	nacionalni program praćenja zdravlja i prehrane u SAD, prema engl. <i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
NK stanice	prirodnoubilačke stanice, prema engl. <i>natural killer cells</i>
PBMC	mononuklearne stanice iz periferne krvi, prema engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	fosfatnim puferom puferirana fiziološka otopina, prema engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PDGF	čimbenik rasta porijekla trombocita, prema engl. <i>platelet-derived growth factor</i>
PE	fikoeritrin, prema engl. <i>phycoerythrin</i>
PWV	brzina pulsno vala, prema engl. <i>pulse wave velocity</i>
RAGE	receptor za krajnje produkte glikacije, prema engl. <i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
ROS	reaktivni kisikovi spojevi, prema engl. <i>reactive oxygen species</i>
sICAM	topive međustanične adhezijske molekule, prema engl. <i>soluble intercellular adhesion molecule</i>
SKT	sistolički krvni tlak
SMK	slobodne masne kiseline
STAT1	prema engl. <i>signal transducer and activator of transcription</i>
SWEET projekt	međunarodni projekt posvećen poboljšanju skrbi za djecu sa šećernom bolešću tipa 1, prema engl. <i>Better control in Pediatric and Adolescent diabeteS: Working to crEate CEnTers of Reference</i>
ŠB1	šećerna bolest tipa 1
TG	trigliceridi
TGF-β	transformirajući čimbenik rasta beta, prema engl. <i>transforming growth factor beta</i>
TIR	vrijeme u ciljnom rasponu, prema engl. <i>time in range</i>
TLR	receptor sličan Tollu, prema engl. <i>Toll-like receptor</i>
TMB	tetrametilbenzidin
TNF-α	čimbenik tumorske nekroze alfa, prema engl. <i>tumor necrosis factor alpha</i>
UK-K	ukupni kolesterol
VCAM-1	vaskularne adhezijske molekule-1, prema engl. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija, prema engl. <i>World Health Organisation</i>

1. UVOD I SVRHA RADA

Niz kroničnih bolesti, onih koji su etiološki uvjetovane imunosnim poremećajem, ali i onih koji to naočigled nisu, povezne su s trajnim stanjem sistemske upale blagog intenziteta (1, 2). Upravo stoga bi terapijske intervencije usmjerene na specifične upalne medijatore mogle pridonijeti liječenju osoba oboljelih ne samo od autoimunskih bolesti, već i oboljelih od raznih metaboličkih i kardiovaskularnih poremećaja, odnosno od komplikacija proizišlih iz tako nastalog upalnog okoliša.

Šećerna bolest tipa 1 (ŠB1) jedna je od najčešćih kroničnih autoimunskih bolesti dječje dobi s više od milijun oboljele djece i adolescenata diljem svijeta (3). Ta su djeca cijeli život ovisna o redovitom primanju inzulina više puta tijekom dana te o disciplini u prehrani i provođenju tjelesne aktivnosti, a svako odstupanje od tog režima rezultira metaboličkim poremećajem s mogućim dugotrajnim posljedicama.

S druge strane, pretilost u djece te komplikacije pretilosti koje se javljaju u gotovo svakom organskom sustavu mladog organizma postaju sve značajniji javnozdravstveni problem. Pretilošću je pogođeno više od 30% djece školske dobi u Sjedinjenim Američkim Državama i u Europi, uključujući i našu zemlju (4-6).

Obje etiološki potpuno različite bolesti dječje dobi u konačnici vode razvoju teških makrovaskularnih i mikrovaskularnih komplikacija, glavnih uzroka mortaliteta suvremenog doba, a koje začetak imaju u oštećenju endotela uzrokovanom upravo kroničnim upalnim stanjem i udruženim metaboličkim poremećajima.

Ovim istraživanjem nastojali smo razjasniti jedan segment kompleksnog imunosnog procesa koji pridonosi održavanju dugotrajnog stanja blage upale u kroničnim bolestima, vođeni idejom da je poznavanje etiologije i patogeneze određenog poremećaja prvi korak k njegovoj prevenciji i liječenju.

1.1. Šećerna bolest tipa 1

Šećerna bolest tipa 1 je kronična, multifaktorijska bolest u koje nepovoljna kombinacija genetskih i okolišnih čimbenika rezultira uništenjem β -stanica gušterače autoimunom reakcijom. Posljedica je nedostatak inzulina što dovodi do niza metaboličkih promjena koje započinju hiperglikemijom. Bolesnici su u konačnici u potpunosti ovisni o egzogenom inzulinu.

Smatra se da u svijetu svake godine više od 98.000 djece mlađe od 15 godina, odnosno gotovo 129.000 mlađih od 20 godina, oboli od šećerne bolesti tipa 1. Procjenjuje se, također da ukupno više od 600.000 djece mlađe od 15 godina živi sa šećernom bolešću, a broj djece, adolescenata i mladih, mlađih od 20 godina penje se preko 1,110.000 (3). Prevalencija i incidencija šećerne bolesti tipa 1 znatno se razlikuju u različitim regijama svijeta tako da četvrtina oboljele djece trenutno živi u Europi, gdje šećerna bolest tipa 1 čini preko 90% od svih oblika šećerne bolesti u djece, a porast incidencije procjenjuje se na oko 3% godišnje (3, 7). Incidencija šećerne bolesti tipa 1 u djece dobi od 0 do 14 godina u Hrvatskoj iznosi više od 17 na 100.000 djece na godinu, s procijenjenim godišnjim povećanjem incidencije od 5,87% (8).

Šećerna bolest tipa 1 nosi teret doživotne, svakodnevne i višekratne kontrole koncentracije glukoze u krvi, injiciranja inzulina te specifičnog režima prehrane, ali i straha od razvoja akutnih i kroničnih komplikacija bolesti (9). Kronične komplikacije u bolesnika s tom bolešću posljedica su funkcionalnih i strukturnih promjena na stijenkama krvnih žila. Promjene na najmanjim ograncima krvožilnog sustava, tzv. mikrovaskularne komplikacije, dobro su definirane na razini nekoliko organskih sustava: u bubrezima gdje dovode do nefropatije, na očnoj pozadini gdje dovode do retinopatije, a zahvaćaju i živčani sustav rezultirajući neuropatijom. Makrovaskularne komplikacije, promjene na velikim krvnim žilama, uzrok su akutnih vaskularnih incidenata, i dok su mikrovaskularne komplikacije uzrokom značajnog morbiditeta i invaliditeta u osoba sa šećernom bolešću potonje su vodeći uzroci smrti u ovih bolesnika (10). U osoba sa šećernom bolešću kronične se komplikacije razvijaju postupno, no istovremeno na više razina i to počevši već od dječje dobi (11). Patofiziologija razvoja kroničnih komplikacija u različitim organima vrlo je slična, a uključuje zajedničke molekularne mehanizme oštećenja malih krvnih žila, no posljedice tih oštećenja specifične su za pojedini organski sustav. Upravo su ti molekularni mehanizmi u fokusu suvremenih istraživanja posvećenih razjašnjavanju patofiziologije šećerne bolesti, a čini se da značajan udio pripada upalnim procesima.

Prepoznati su i dobro definirani čimbenici rizika za razvoj kroničnih komplikacija šećerne bolesti. Dio čimbenika rizika podložan je utjecaju samih bolesnika pa svrhu i cilj liječenja bolesnika sa šećernom bolešću predstavlja upravo kontrola tih čimbenika. Međunarodno udruženje za pedijatrijsku i adolescentnu dijabetologiju (ISPAD, prema engl. *International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes*), Američko dijabetološko društvo (ADA, prema engl. *American Diabetes Association*) i Američko udruženje za bolesti srca (AHA, prema engl. *American Heart Association*) preporučili su ciljne vrijednosti metaboličkih parametara te dali preporuke o načinu života kako bi se smanjio rizik razvoja mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti. Te ciljne vrijednosti su: HbA1c (glikirani hemoglobin, hemoglobin A1c) < 7,0%, LDL-kolesterol (kolesterol u lipoproteinima niske gustoće, prema engl. *low-density lipoprotein*) < 2,6 mmol/L, HDL-kolesterol (kolesterol u lipoproteinima visoke gustoće, prema engl. *high-density lipoprotein*) > 1,1 mmol/L, trigliceridi < 1,7 mmol/L, krvni tlak < 90. c. ili < 130/90 mmHg, indeks tjelesne mase (ITM) < 85 c. te nepušenje (Tablica 1) (12-15).

Zahvaljujući suvremenoj tehnologiji i razvoju inzulinskih pripravaka djelovanja prilagođenih potrebama bolesnika, kontrola glikemije i načini primjene inzulina postaju sve jednostavniji i prilagodljiviji pojedincu te značajno veći udio bolesnika postiže zadovoljavajuću kontrolu bolesti. Ipak niti jedan od dostupnih terapijskih pristupa ne može potpuno spriječiti pojavu ni akutnih komplikacija bolesti u vidu hipoglikemije ili hiperglikemije niti kroničnih mikrovaskularnih oštećenja što nalaže potrebu za učinkovitijim terapijskim rješenjima.

Tablica 1. Preporuke o kontroli čimbenika rizika za razvoj mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti tipa 1 u djece i adolescenata

	ISPAD (12)	ADA (13)	AHA (14,15)
Kontrola glikemije	Sve dobne skupine HbA1c < 7,0% (ukoliko je moguće postići bez teških hipoglikemija)	Sve dobne skupine HbA1c < 7,0% individualizirana procjena i prilagodba cilja od < 6,5 do < 8%	HbA1c < 7,0% (neovisno o dobi i tipu bolesti)
Kontrola lipidemije	LDL-kolesterol < 2,6 mmol/L HDL-kolesterol > 1,1 mmol/L Trigliceridi < 1,7 mmol/L	LDL-kolesterol < 2,6 mmol/L HDL-kolesterol > 1,1 mmol/L Trigliceridi < 1,7 mmol/L	LDL-kolesterol < 2,6 mmol/L
Kontrola krvnog tlaka	Sistolički / dijastolički krvni tlak < 90 c. (u adolescenata < 130/80 mmHg)	Sistolički / dijastolički krvni tlak < 90c. (≥ 13 godina < 120/80 mmHg)	Sistolički / dijastolički krvni tlak < 90 c
Kontrola tjelesne mase	ITM < 95 c.	„normalan“ ITM	ITM < 85. C
Navike (pušenje)	Ne preporučuje se	Ne preporučuje se	Ne preporučuje se

ISPAD – Međunarodno udruženje za pedijatrijsku i adolescentnu dijabetologiju, prema engl. *International Society for Pediatric and Adolescent Diabetology*; ADA – Američko dijabetološko društvo, prema engl. *American Diabetes Association*; AHA – Američko udruženje za bolesti srca, prema engl. *American Heart Association*; HbA1c – glikirani hemoglobin A1, hemoglobin A1c; LDL-kolesterol – kolesterol u lipoproteinima niske gustoće, prema engl. *low-density lipoprotein*; HDL-kolesterol – kolesterol u lipoproteinima visoke gustoće, prema engl. *high-density lipoprotein*; ITM – indeks tjelesne mase

1.2. Pretilost

Pretilost koja se javlja u dječjoj dobi predstavlja značajan javnozdravstveni problem u svim razvijenijim zemljama svijeta. U Hrvatskoj, prema podacima Hrvatskog zdravstveno-statističkog ljetopisa iz 2016. godine, prekomjernu tjelesnu težinu je imalo oko 13% osnovnoškolske i srednjoškolske djece, dok je 18% djece u osnovnim školama i 13% djece u srednjim školama bilo pretilo (16). Samo tri godine kasnije, prema podacima iz Hrvatskog zdravstveno-statističkog ljetopisa za 2019. godinu, preuhranjeno je bilo 32,1% osnovnoškolske djece i 26,9% srednjoškolaca (17), dok je 2022. godine preuhranjeno bilo 35,6% svih učenika osnovnih škola te 26,0% učenika i 29,8% učenica srednjih škola (18). S time u skladu su i podatci dobiveni istraživanjem prevalencije prekomjerne tjelesne težine i pretilosti školske djece dobi 7 do 9,9 godina provedeno u sklopu sustavnog praćenja koordiniranog od strane europske podružnice Svjetske zdravstvene organizacije (WHO/Europe coordinated surveillance system, COSI), a prema kojima više od trećine djece (35,9%) ima prekomjernu tjelesnu težinu ili je pretilo, uz značajnu predominaciju dječaka, posebice u udjelu pretile djece (18,4% dječaka vs. 10,8% djevojčica), odnosno djece s teškom pretilošću (među dječacima 5,3%) (6). Tim smo se statističkim pokazateljima približili zapadnoeuropskim zemljama i Sjedinjenim Američkim Državama gdje je svako treće dijete školske dobi pretilo ili ima prekomjernu tjelesnu težinu (19). Postoje značajne razlike u prevalenciji pretilosti u različitim regijama svijeta, ali i unutar pojedinih zemalja zahvaćenih pandemijom pretilosti postoje razlike između različitih etničkih i socioekonomskih skupina, s većim udjelom pretile djece među siromašnijom populacijom (19).

Najčešći uzrok pretilosti u djece je pozitivna bilanca energije, odnosno veći unos energije hranom u odnosu na energiju potrošenu tjelesnom aktivnošću, uz genetsku predispoziciju i konstitucijsku sklonost debljanju. Iako se u pretile djece izuzetno rijetko nađe endokrini uzrok pretilosti ili definirani genetski etiološki faktor, nasljedni čimbenici imaju snažnu ulogu u sklonosti pretilosti, bilo da se radi o multifaktorijalnom genetskom nasljeđu ili obiteljskom okružju i navikama s kojima dijete odrasta. Tako pretilost u jednog od roditelja povećava rizik razvoja pretilosti u djeteta dva do tri puta, a ukoliko su oba roditelja pretila rizik se povećava 15 puta (20). Ne smijemo pritom zanemariti i šire socijalno okružje te trendove u ponašanju koji obilježavaju pojedina ekonomska razdoblja definirana razvojem industrije i medija. Tako trenutno prevladava tzv. „obezogeno“ razdoblje u kojem je razvoj industrije doveo do raspoloživosti jeftinih zaslađenih pića i hrane bogate zaslađivačima, zasićenim masnoćama i ostalim nekvalitetnim kalorijama, a tjelesna aktivnost postaje iznimka. Školska

igrališta su prazna, djeca dane provode pred različitim elektronskim medijima, a sve su dostupnija priručna prijevozna sredstva na električni pogon. Stoga je liječenje pretilosti u djece izrazito teško i mukotrpno te u konačnici najčešće daje vrlo skromne rezultate. Naime, jedino učinkovito liječenje pretilosti je promjena životnih navika, odnosno smanjenje unosa energije i sustavno povećanje tjelesne aktivnosti što zahtijeva dosljednost, uključenost cijele obitelji i sustavno modificiranje društvenih normi koje su se zadnjih desetljeća nametnule. Svaki od navedenih koraka izuzetno je teško provodiv. Iako i dalje društvo cijeni i nagrađuje preventivne programe, sve smo svjesniji da napore treba usmjeriti sekundarnoj, pa i tercijarnoj prevenciji. Naime, pretila djeca vrlo rano razvijaju komplikacije kao što su ortopedski poremećaji (21), prije svega u vidu *valgus* deformiteta koljena i spuštenih stopala te respiratorni problemi sa sve većim udjelom djece koja boluju od astme (22). Povećanje prevalencije pretilosti u djece prati i pojava komorbiditeta koji su se donedavno javljali isključivo u odrasloj dobi, a uključuju šećernu bolest tipa 2, hipertenziju, steatozu jetre, opstruktivnu apneju u snu i dislipidemiju. Svaki od njih dodatno povećava rizik razvoja kardiovaskularnih komplikacija bolesti (23). Javljaju se i razvojni problemi specifični za dob i to u području reproduktivnog, ali i mentalnog zdravlja (4, 19). U pretile djece narušena je i psihosocijalna homeostaza, ta su djeca podložna stigmatizaciji, imaju sniženo samopoštovanje i kvalitetu života te su sklonija anksioznosti i drugim psihičkim tegobama koje im otežavaju suočavanje s osnovnim problemom i pridonose produbljenju njihovih tegoba (24). Nažalost, veliki udio pretile djece svoju debljinu prenosi u odraslu dob, posebice oni koji su pretili i u doba adolescencije, u kojih je pretilost težeg stupnja te ona djeca čiji su roditelji pretili (4, 19, 20). Pretila djeca postaju pretili odrasli, a potom i pretili roditelji novih naraštaja, a kroz život od rane dobi nose začetke kroničnih komplikacija koji ih sustižu već u ranoj odrasloj dobi. Istovremeno, u pretilih se osoba od dječje dobi može pratiti razvoj endotelne disfunkcije koja je prvi znak krvožilnih komplikacija i s jedne strane vodi razvoju ateroskleroze, a s druge strane oštećenju najmanjih krvnih žila. Endotelna disfunkcija pridonosi ranoj pojavi i brzom progresiji mikrovaskularnih komplikacija u osoba koje razviju šećernu bolest tipa 2 (25-29). Do prije tridesetak godina smatralo se da je šećerna bolest tipa 2 isključivo bolest odraslih i starijih osoba, no uočava se pojava i povećanje incidencije te bolesti već u dječjoj dobi. Iako procjene nisu precizne kao u slučaju šećerne bolesti tipa 1 smatra se da samo u Sjedinjenim Američkim Državama preko 20.000 adolescenata boluje od šećerne bolesti tipa 2 (30), dok je znakove predijabetesa moguće uočiti u oko 5% djece dobi 6 do 10 godina (31).

1.3. Krvožilne promjene u djece sa šećernom bolešću tipa 1 i u pretile djece

1.3.1. Čimbenici rizika za razvoj ateroskleroze

Djetinjstvo i adolescencija predstavljaju razdoblje u životu posebno osjetljivo za razvoj rizičnih čimbenika razvoja bolesti srca i krvnih žila, koji su izraženiji i brojniji u pretile djece te u djece sa šećernom bolešću (Tablica 1). Tako se dva ili više čimbenika rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti nalazi u 14% djece sa šećernom bolešću tipa 1 te u 92% djece sa šećernom bolešću tipa 2 (32, 33), dok se kronične krvožilne komplikacije razvijaju u 32% mladih sa šećernom bolešću tipa 1 i u 72% onih sa šećernom bolešću tipa 2 (33, 34).

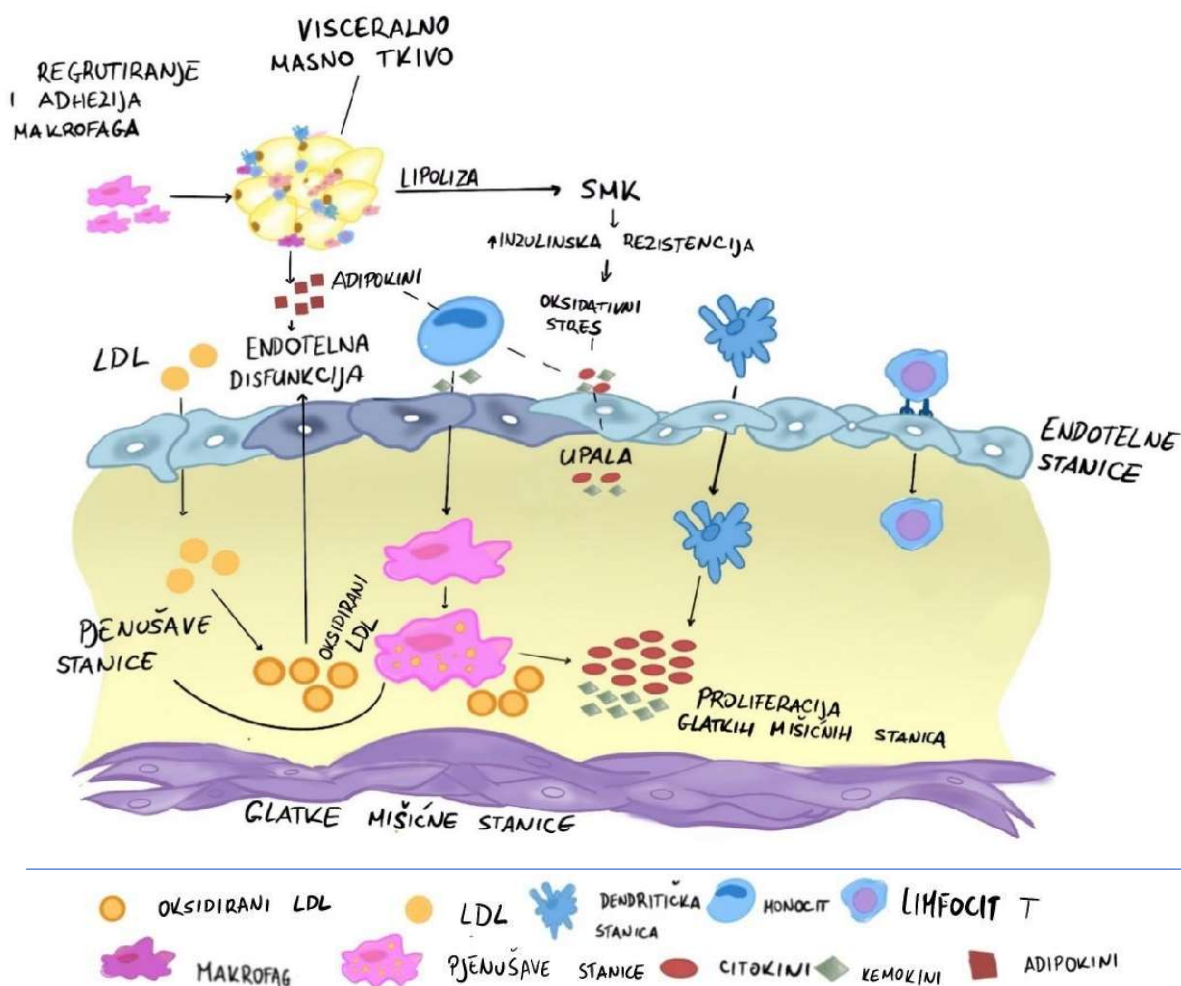
Većinu čimbenika rizika moguće je kontrolirati, od onih antropometrijskih do metaboličkih. Tu prvenstveno pripadaju vrijednosti ITM i opseg struka, čije se povećanje bilježi ne samo u pretile djece, već i u djece sa šećernom bolešću tipa 1, a praćeni su brojnim metaboličkim komplikacijama, primjerice inzulinskom rezistencijom, hiperlipidemijom, oštećenjem jetre (32, 35). U djece sa šećernom bolešću i glikemija mjerena udjelom HbA1c predstavlja važan čimbenik rizika korelirajući značajno s izraženijim makrovaskularnim komplikacijama (33, 36). Zadnjih se godina sve više važnosti kao čimbeniku rizika pridaje glukovarijabilnosti, odnosno broju i amplitudama glikemijskih fluktuacija (33, 37, 38), a uporaba senzora za kontinuirano mjerenje glikemije omogućava procjenu i praćenje tog parametra u svakodnevnom životu.

1.3.2. Patofiziologija ateroskleroze

Razvoj ateroskleroze tih je i podmukao, no složen proces koji nerijetko započinje već u dječjoj dobi (11, 39), posebice uz postojanje većeg broja rizičnih čimbenika. Na te je prve promjene u stijenci krvnih žila moguće djelovati, ali ih je, nažalost, gotovo nemoguće detektirati (39). Aterosklerotskim procesom prvo su zahvaćene velike i srednje velike arterije, s mišićnim slojem u stijenci i to na razini više organskih sustava (39). Sam proces započinje u proupalnom okružju hipertrofičnog masnog tkiva, u kojem dolazi do pojačanog lučenja adipokina, lipolize i otpuštanja slobodnih masnih kiselina koje posreduju razvoj inzulinske rezistencije i oksidativnog stresa te potiču upalnu kaskadu, dovodeći do aktivacije upalnih stanica te susljednog otpuštanja citokina i kemokina. Istovremeno dolazi do sekvestracije cirkulirajućih čestica LDL-kolesterola, pomoću proteoglikana matriksa stijenske krvnih žila i

njihove oksidacije (11). Oksidirani lipoproteini također imaju jako proupalno djelovanje te potiču endotelne stanice na izražaj niza adhezijskih molekula kao što su vaskularne i međustanične adhezijske molekule (VCAM-1, prema engl. *vascular cell adhesion molecule 1*; ICAM-1, prema engl. *intercellular adhesion molecule 1*), kemokina (CCL2, CCL5, CXCL10, prema engl. *C – C motif ligand*; *C – X – C motif ligand*), čimbenika rasta, kao što su čimbenik rasta iz trombocita (PDGF, prema engl. *platelet-derived growth factor*), čimbenik rasta fibroblasta (FGF, prema engl. *fibroblast growth factors*), čimbenik rasta sličan inzulinu (IGF, prema engl. *insulin-like growth factor*), transformirajući čimbenik rasta- β (TGF- β , prema engl. *transforming growth factor beta*), te upalnih citokina, poput interleukina 1 (IL-1) i čimbenika tumorske nekroze alfa (TNF- α , prema engl. *tumor necrosis factor alpha*). Iako u normalnim okolnostima cirkulirajući leukociti ne prijanjaju za endotel krvnih žila, u okolnostima oštećenog endotela i pojačanog izražaja adhezijskih molekula i kemokina, leukociti se selektivno vežu na površinu endotela, a potom migriraju u samu stijenku. Na taj način cirkulirajući monociti naseljavaju zahvaćeno područje krvožilne stijenke, aktiviraju se i diferenciraju u makrofage. Aktivirani makrofagi potom fagocitiraju suvišak sekvestriranog i oksidiranog LDL- kolesterola te, pohranjujući ga u unutarstanična zrnca, poprimaju pjenušav izgled, odnosno postaju pjenušave stanice čije nakupljanje čini masne tračke (pruge) (11, 40) (Slika 1).

Istovremeno aktivirani makrofagi otpuštaju citokine, uključujući IL-1 i IL-6 te privlače i ostale upalne stanice (monocite, mastocite, aktivirane limfocite T) što potiče dodatno sekvestriranje i oksidaciju LDL-kolesterola. Proupalno djelovanje makrofaga i pjenušavih stanica putem citokina i kemokina potiče glatke mišićne stanice medije stijenke krvnih žila na proliferaciju i migraciju prema sloju intime. S vremenom se plakovi povećavaju, fibroziraju i kalcificiraju te mogu krvariti, ulcerirati i rupturirati, čime dovode do tromboze zahvaćenih krvnih žila. Trombotičke okluzije u konačnici dovode od kliničkih manifestacija krvožilnih bolesti u vidu infarkta miokarda, cerebrovaskularnog incidenta ili pak gangrene udova (11, 41).



Slika 1. Patofiziologija razvoja ateroskleroze. Pretilost i šećerna bolest predstavljaju proupalno stanje u kojem dolazi do pojačanog lučenja adipokina te lipolize i otpuštanja slobodnih masnih kiselina koje posredujući inzulinsku rezistenciju i razvoj oksidativnog stresa, započinju upalnu kaskadu dovodeći do aktivacije upalnih stanica te susljednog otpuštanja citokina i kemokina. Opisani proces u konačnici vodi disfunkciji i oštećenju endotela krvnih žila. Kroz oštećeni endotel LDL ulazi u stijenku krvne žile gdje dolazi do oksidativne modifikacije LDL-a. Oksidirani LDL podliježe fagocitozi od strane tkivnih makrofaga koji nakupljanjem LDL-a postaju pjenušave stanice. Lizofosfatidna kiselina, koja je sastavni dio LDL-čestica, potiče endotel na izražavanje kemokina koji privlače monocyte putem odgovarajućih receptora na njihovoj površini, a nakupljanje oksidiranog LDL-a u pjenušavim stanicama potiče transformirane makrofage na otpuštanje citokina i kemokina te pogoduje i izražavanju adhezijskih molekula na površini endotelnih stanica. Adhezijske molekule na površini endotelnih stanica vežu i privlače u krvožilnu stijenku dendritičke stanice i limfocite T. Opisani procesi dovode do nakupljanja lipida i debris, te nekroze makrofaga, daljnjeg otpuštanja proupalnih molekula, privlačenja drugih upalnih stanica te amplifikacije opisanog procesa što rezultira stvaranjem plaka. Otpušteni citokini i kemokini potiču i proliferaciju glatkih stanica krvožilne stijenke koje učvršćuju i stabiliziraju plak. Povećanjem plaka glatke mišićne stanice stvaraju površinski zaštitni sloj kolagena i elastina koji štiti lumen krvne žile od nekrotične tvari. Kada takva lezija rupturira, na mjestu rupture se nakupljaju trombociti stvarajući tromb. LDL – lipoprotein niske gustoće, prema engl. *low-density lipoprotein*; SMK – slobodne masne kiseline.

K.U. Modificirano prema: Hajjar DP and Gotto AM. Biological Relevance of Inflammation and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Arterial Diseases. *Am J Pathol* 2013;182: 1474e1481; van der Vorst EP, Döring Y, Weber C. Chemokines and their receptors in Atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)*. 2015 Sep;93(9):963-71.

Studije provedene na uzorcima autopsija djece i mladih stradalih od nekardiovaskularnih incidenata pokazale su aterosklerotske promjene već od najranije dobi u vidu masnih tračaka u aorti i koronarnim arterijama. Jedna od najpoznatijih takvih studija je "*the Bogalusa Heart Study*" kojom je uočena pojava masnih tračaka i pruga u aortama i koronarnim arterijama 50% prethodno zdrave djece dobi 2 do 15 godina te u 85% osoba dobi od 21 do 39 godina, dok su uzdignuti plakovi opisani u 8 do 18% djece te u 60 do 69% mladih odraslih (42). Također je utvrđeno da se incidencija aterosklerotskih promjena u krvnim žilama povećava s dobi, vrijednostima ITM, krvnim tlakom i koncentracijama ukupnog i LDL-kolesterola.

1.3.3. Razvoj ateroskleroze u rizičnim skupinama djece

Šećerna bolest i pretilost, predstavljaju važan skup čimbenika rizika za razvoj ateroskleroze, a sam proces posreduju metabolički poremećaji zajednički u oba navedena stanja. U osoba sa šećernom bolešću rizik razvoja aterosklerotskih lezija je dva do deset puta veći nego u njihovih zdravih vršnjaka te ne iznenađuje činjenica da je u toj skupini bolesnika povećan morbiditet i mortalitet uzrokovan koronarnom bolešću, cerebrovaskularnim incidentima te bolestima velikih arterija (43). Iako se navedene komplikacije događaju u odrasloj dobi, prve promjene u stijenci krvnih žila vidljive su već u djece, uz značajnu progresiju kod postojanja rizičnih čimbenika (43, 44).

Postupci kojima se pokušavalo dokazati postojanje promjena u stijenci krvnih žila u živih osoba temeljile su se na invazivnim i skupim slikovnim metodama te indirektnoj procjeni mjerenjem protoka u krvnim žilama *Doppler*-metodom, no blage promjene moglo se uočiti tek postmortalnim, histološkim pregledom. Zahvaljujući razvoju ultrasonografije visoke rezolucije, mjerenje debljine sloja intima-medija stijenke zajedničke karotidne arterije postalo je neinvazivni marker subkliničke ateroskleroze (42, 43, 45, 46). Značajno zadebljanje endotela uočeno je već u dječjoj dobi i to u pretiloj djece (47), u djece s familijarnom hiperkolesterolemijom (48) te u djece sa šećernom bolešću tipa 1 (44). U istraživanju provedenom u Klinici za pedijatriju, KBC-a Zagreb, također je uočeno zadebljanje sloja intima-medija stijenke zajedničke karotidne arterije u djece sa šećernom bolešću u odnosu na zdrave ispitanike, ali i u odnosu na njihove pretila vršnjake (49). U skupini djece sa šećernom bolešću također su nađene promijenjene vrijednosti funkcijskih parametara koji upućuju na povećanu krutost arterijske stijenke. U skupini pretila djece smanjena arterijska popustljivost uočena je u djevojčica te u djece s povišenim krvnim tlakom, dok su u skupini djece sa šećernom bolešću

pokazatelje povećane krutosti arterijske stijenke imala djeca s duljim trajanjem šećerne bolesti, višim vrijednostima ITM, višim sistoličkim i dijastoličkim krvnim tlakom te višim postotkom HbA1c (49). Uočeno je da i glukovarijabilnost znatno pridonosi promjenama stijenke krvnih žila. U osoba sa šećernom bolešću tipa 2 uočene su promjene parametara krutosti aorte (izraženom kao PWV, prema engl. *pulse wave velocity*) ovisno o parametrima varijabilnosti glikemije, sugerirajući veću krutost stijenke u osoba čija je glikemija kraće vrijeme bila unutar ciljnog raspona (TIR, prema engl. *time in range*), odnosno koji su imali povećan koeficijent varijabilnosti glikemije (38). I u novijim studijama potvrđena je povezanost varijabilnosti glikemije, procijenjena analizom podataka sustava za kontinuirano mjerenje glikemije, s promjenom funkcionalnih karakteristika stijenke krvnih žila u osoba sa šećernom bolešću tipa 2 koje nemaju bolest srca i krvnih žila (50). Istovremeno, povezanost vremena provedenog s glikemijom unutar ciljnih vrijednosti s parametrima funkcije i debljine stijenke krvnih žila u odraslih osoba oboljelih od šećerne bolesti tipa 1 nije utvrđena (51).

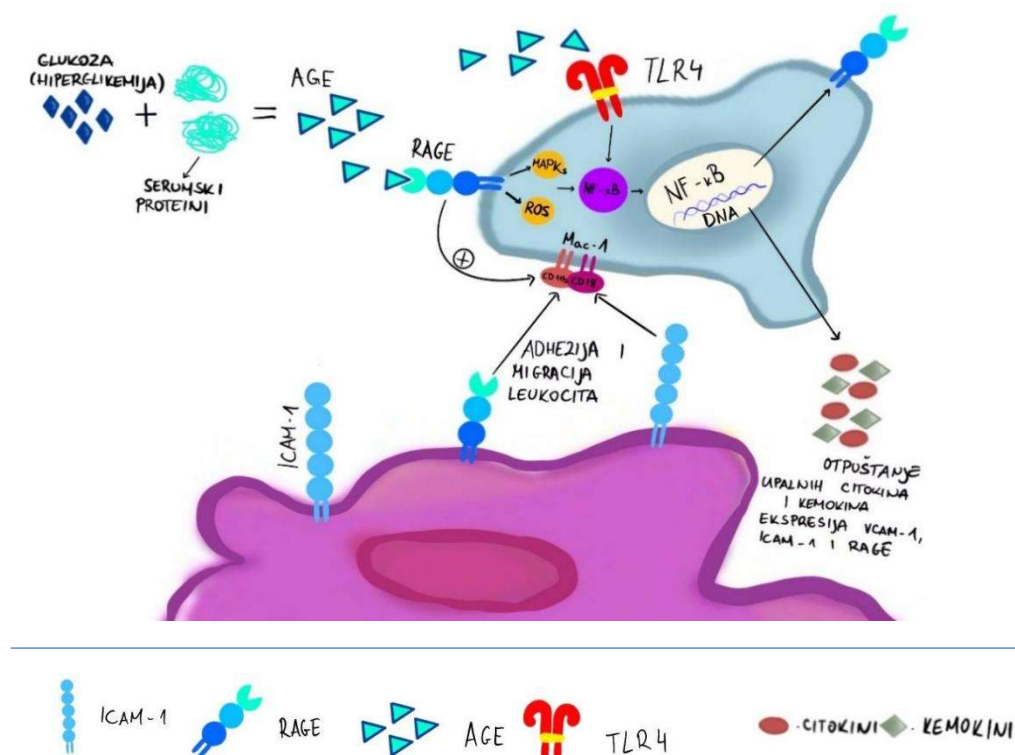
1.3.4. Uloga upale kao glavnog čimbenika rizika za razvoj krvožilnih komplikacija

Sve je više dokaza da u razvoju endotelne disfunkcije, koja je temelj morbiditeta i mortaliteta pretilih osoba glavnu ulogu ima upalno stanje te da je organizam pretila osobe u stanju kronične upale blagog intenziteta (52-55). Isto vrijedi i za naizgled potpuno različit nozološki entitet, šećernu bolest tipa 1. Obje bolesti obilježava razvoj metaboličkih komplikacija (Tablica 1), koje su laboratorijski mjerljive i koje različitim patofiziološkim mehanizmima ostvaruju uzročnu vezu s razvojem i postojanjem upalnog okoliša koji vodi endotelnoj disfunkciji i vaskularnim komplikacijama. Osim promjena u stijenki velikih krvnih žila, metabolički poremećaji pogoduju i razvoju mikrovaskularnih komplikacija, a smatra se da u oba procesa ključnu ulogu ima razvoj inzulinske rezistencije (52, 56).

1.3.5. Patofiziologija razvoja upale osoba sa šećernom bolešću tipa 1 i u pretilih osoba

U osoba sa šećernom bolešću najizraženiji metabolički poremećaj je hiperglikemija. U uvjetima hiperglikemije ubrzano se stvaraju krajnji produkti glikacije (AGE, prema engl. *advanced glycation endproducts*). Vežući se na receptor za AGE (RAGE), spojevi AGE potiču razvoj upalnog odgovora (57-59). Hiperglikemija, uzrokujući oksidativni stres, sudjeluje i u

aktivaciji receptora sličnih *Toll-u* (TLR, prema engl. *Toll-like receptor*), također učinkovitih pokretača upalnog procesa (60-62). Djelujući, pak, na složenu staničnu i molekularnu mrežu koja gradi strukturno i funkcionalno cjelovitu krvožilnu stijenku, tako pokrenut upalni proces posreduje razvoj mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti (57-60, 62).

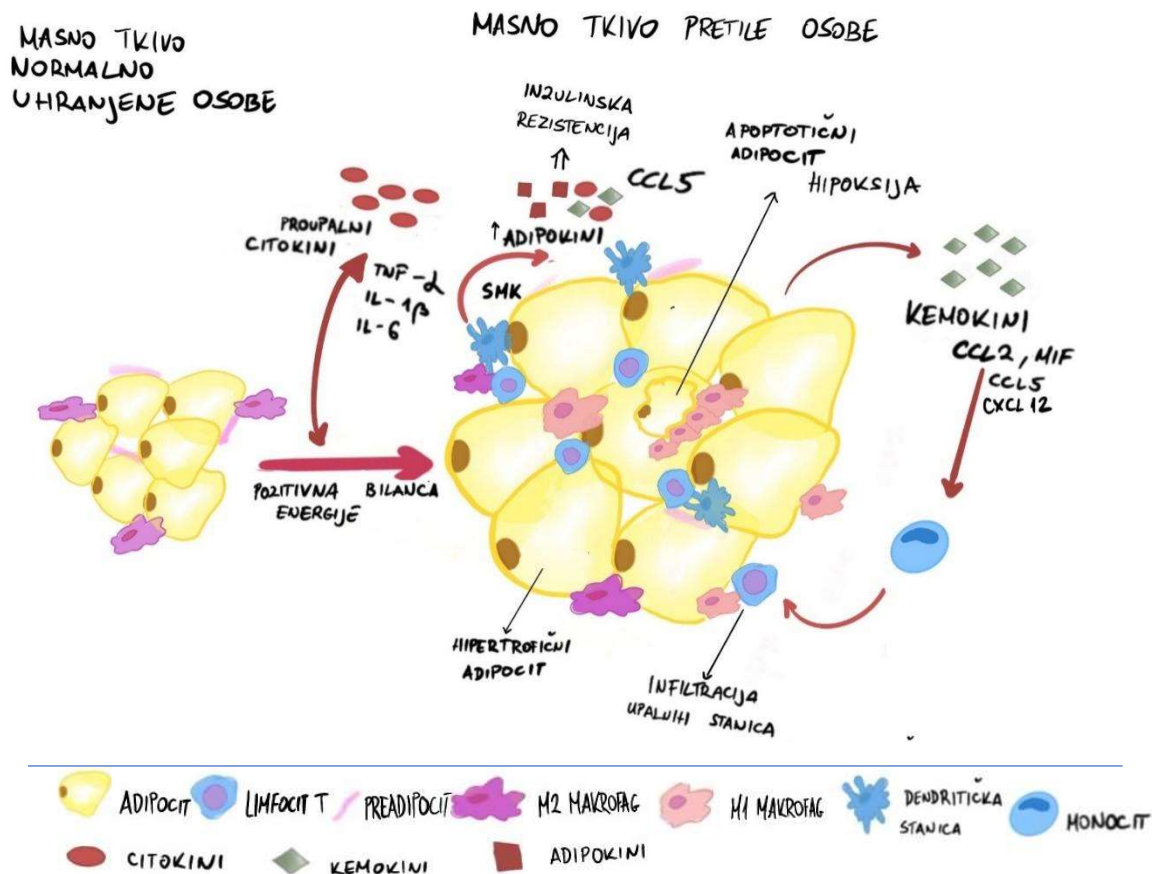


Slika 2. Mehanizam pokretanja upalne reakcije hiperglikemijom. Visoke koncentracije glukoze u interakciji sa serumskim proteinima tzv. Maillardovom reakcijom dovode do stvaranja spojeva AGE koji se u međustaničnom prostoru vežu na odgovarajuće receptore RAGE na površini endotelih stanica. Vezanje spojeva AGE za receptore pokreće signalne kaskade, aktivirajući oksidazu NADPH koja potiče stvaranje spojeva ROS i aktivaciju MAP-kinaza (MAPK), koje u konačnici vode aktivaciji transkripcijskog čimbenika NF-κB. Opisana signalna kaskada pokreće se i vezanjem spojeva AGE za receptore TLR4, pritom stvarajući kompleks AGE-MD2-TLR4, koji također vodi aktivaciji čimbenika NF-κB putem MAPK. Aktivacija NF-κB ključni je korak u poticanju upalnog procesa jer vodi translokaciji toga spoja u jezgru, gdje potiče transkripciju ciljnih gena za adhezijske molekule, citokine, kemokine i tkivne čimbenike rasta. AGE – krajnji produkti glikacije, prema engl. *advanced glycation end-product*; RAGE – receptor za krajnje produkte glikacije, prema engl. *receptor for advanced glycation end products*; NADPH-oksidaza – nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat oksidaza, prema engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*; ROS – reaktivni kisikovi spojevi, engl. *reactive oxygen species*; MAPKs – protein-kinaze aktivirane mitogenom, prema engl. *mitogen-activated protein kinases*; NF-κB – jezgrin čimbenik kapa B, prema engl. *nuclear factor kappa B*; TLR4 – „Toll-like“ receptor 4; MD2 – ko-receptor TLR4, prema engl. *myeloid differentiation 2*.

K.U. Modificirano prema: Hegab Z, Gibbons S, Neyses L, Mamas AM. Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. *World J Cardiol* 2012; 4(4): 90-102; Wang Y, Luo W, Han J, Khan ZA, Fang Q, Jin Y, i sur. MD2 by direct AGE interaction drives inflammatory diabetic cardiomyopathy. *Nat Commun* 2020;11:2148.

S druge strane, nekoliko je teorija kojima se pokušava objasniti začetak upalnog procesa u pretilih osoba. Jedna od teorija počinje od zapažanja da pretilost ima negativan utjecaj na postojanost funkcije crijevne barijere, što u pretilih osoba omogućava translokaciju bakterijskih antigena, prije svega lipopolisaharidnih dijelova stanične membrane, u mezenterijski limfni sustav, a potom i u cirkulaciju (52, 63). U cirkulaciji te lipopolisaharidne antigene prepoznaje imunostani sustav te pokreće upalnu kaskadu i podržava upalno stanje niskog intenziteta. Istovremeno putem lipopolisaharida dolazi i do aktivacije tkivnih makrofaga u masnom tkivu, ali i u Langerhansovim otočićima gušterače, povećava se lučenje citokina i kemokina, što potiče regrutiranje i sazrijevanje drugih upalnih stanica te, u konačnici, utječe na funkciju i postojanost β -stanica (52, 63). Prema drugoj teoriji, u pretilih osoba, nakon zasićenja masnog tkiva dolazi do nakupljanja lipidnih molekula u „nemasnom tkivu“, koje reagira na suvišak slobodnih masnih kiselina. Slobodne masne kiseline potiču aktivaciju makrofaga te stvaranje kemokina, a proces je značajno jači ukoliko postoji nepotpuna oksidacija slobodnih masnih kiselina (52, 63). Prema trećoj teoriji, hipertrofija adipocita dovodi do njihove disregulacije i potiče lučenje adipokina i citokina, što modulira upalni odgovor i potiče kronično upalno stanje. Upali pridonosi i relativna hipoksija u masnom tkivu, koja je posljedica ekspanzije masnog tkiva koju ne prati odgovarajuća vaskularizacija (52, 63) (Slika 3).

Početno lučenje citokina i kemokina, uz regrutiranje drugih upalnih stanica koje i same luče proupalne molekule, stvara začarani krug koji održava upalno stanje. Upala, s druge strane, negativno djeluje na osjetljivost na inzulin, uzrokujući inzulinsku rezistenciju, te pogoduje amplifikaciji metaboličkih poremećaja koji dodatno pridonose upalnom procesu i oštećenju tkiva (52). Opisani upalni procesi zbivaju se i na razini vrlo lokaliziranog okružja, u Langerhansovim otočićima gušterače, gdje suvišak lipida s jedne strane mijenja lučenje inzulina, a s druge strane potiče upalnu kaskadu u kojoj citokini i kemokini posreduju razvoj inzulitisa i uništenje β -stanica (63-65). Na taj je način dokazano da postoje brojna preklapanja u etiopatogenezi šećerne bolesti tipa 1 i tipa 2, koje je donedavno povezivalo samo ime i za koje se smatralo da predstavljaju patofiziološki sasvim različite entitete.



Slika 3. Mehanizam razvoja upale u masnom tkivu u pretilih osoba – ekspanzija masnog tkiva i rezultirajuća upala i metabolička disregulacija. Pozitivna bilanca energije dovodi do hipertrofije adipocita i ekspanzije masnog tkiva. Hipertrofični adipociti počinju lučiti proupalne citokine i kemokine koji privlače upalne stanice u ekspanzirano masno tkivo. Uz adipocite, i regrutirane upalne stanice luče citokine ($TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ i $IL-6$) i kemokine ($CCL2$, $CCL5$, MIF , $CXCL12$) potičući proupalni fenotip tkivnih makrofaga koji se od mirujućih makrofaga M2, transformiraju u proupalne makrofage M1. Makrofagi M1 podržavaju i pojačavaju upalno stanje i sami lučeći proupalne molekule i posredujući razvoj inzulinske rezistencije na razini postreceptorskog signalnog puta. Istovremeno opisano okruženje pogoduje lipolizi te dolazi do otpuštanja slobodnih masnih kiselina koje modificiraju djelovanje inzulina te dodatno pogoduju razvoju inzulinske rezistencije. Ekspanziju masnog tkiva ne prati odgovarajuća angiogeneza rezultirajući hipoksijom u pojedinim, nedovoljno prokrvljenim dijelovima. SMK – slobodne masne kiseline; $TNF-\alpha$ – čimbenik tumorske nekroze alfa, prema engl. *tumor necrosis factor alfa*; $IL-1\beta$ – interleukin 1 beta; $IL-6$ – interleukin 6; MIF – čimbenik inhibicije kretanja makrofaga, prema engl. *macrophage migration inhibitory factor*; CCL – kemokinski ligand s C-C motivom; $CXCL$ – kemokinski ligand s C – X – C motivom.

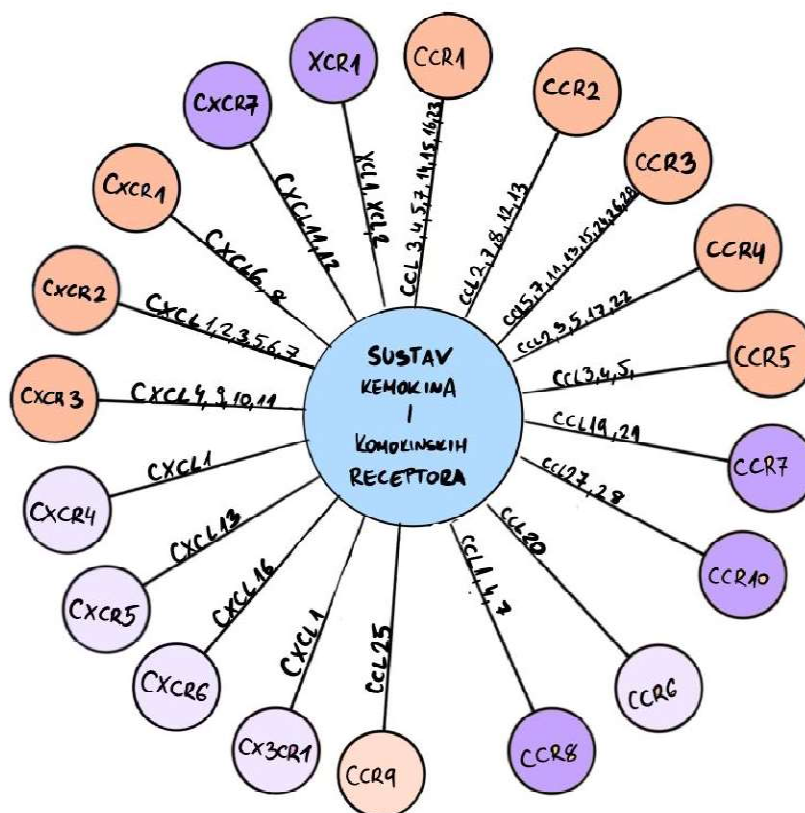
K.U. Modificirano prema McArdle MA, Finucane OM, Connaughton RM, McMorrow AM, Roche HM. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: insights into the emerging role of nutritional strategies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013 May 10;4:52; Kawai T, Autieri MV, Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2021 Mar 1;320(3):C375-C391

1.4. Kemokini i kemokinski receptori

Kemotaktični citokini, odnosno kemokini (prema engl. *chemotactic cytokine*), mali su signalni polipeptidi veličine 8 do 10 kDa koji upravljaju novačenjem i navođenjem imunostanih stanica u fiziološkim i patološkim uvjetima. U ljudi je poznato pedesetak različitih kemokina te dvadesetak kemokinskih receptora. Kemokini se dijele u četiri skupine na temelju broja i smještaja N-terminalnih cisteinskih ostataka u kemokinskoj domeni. Glavne skupine su kemokinski ligandi s C – C motivom (CCL, prema engl. *C – C motif ligand*), gdje su cisteinski ostaci smješteni jedan pored drugoga i kemokinski ligandi s C – X – C motivom (CXCL, prema engl. *C – X – C motif ligand*) u kojima su N-terminalni cisteinski ostaci odvojeni jednom aminokiselinom. Potonja skupina dodatno se dijeli na onu u koje se uz N-terminalni cisteinski ostatak nalazi motiv glutaminska kiselina – leucin – arginin (kemokini ELR: CXCL1 i CXCL8) te na skupinu koja ne sadrži navedeni motiv (non – ELR). U tu skupinu pripadaju tri strukturno i funkcijski slična kemokina koja potiče interferon (INF): CXCL9, CXCL10 i CXCL11 (66-68).

Kemokini ostvaruju biološku ulogu putem specifičnih receptora na površini ciljnih stanica (CCR, prema engl. *C – C motif receptor* i CXCR, prema engl. *C – X – C motif receptor*). Kemokinski receptori pripadaju superobitelji receptora spregnutih s G-bjelančevinama. Nakon vezanja liganda dolazi do konformacijskih promjena koje rezultiraju promjenom gvanozindifosfata (GDP) u gvanozin-trifosfat (GTP) i aktivacijom heterotrimeričke G-bjelančevine (63, 67, 69, 70). Spomenutu heterotrimeričku strukturu čini više različitih podjedinica $G\alpha$, $G\beta$ i $G\gamma$, koje pridonose kompleksnosti signalnog odgovora. Različiti kemokinski ligandi koji se vežu za isti receptor stoga postižu različite molekularne učinke te dovode do specifičnog biološkog odgovora. Takva različitost konačnog odgovara na aktivaciju receptora omogućava da oko pedesetak različitih kemokina svoja specifična djelovanja ostvaruje putem dvadesetak kemokinskih receptora. Spomenuta paradigma prema kojoj jedan receptor može polučiti različiti biološki odgovor ovisno o ligandu koji se veže na njega naziva se funkcionalna selektivnost („*biased agonism*“) (63, 70, 71) (Slika 4).

Djelovanja kemokina nakon vezanja za kemokinski receptor uključuju usmjerenu kemotaksiju ciljnih stanica, promjene u funkciji unutarstaničnih drugih glasnika te djelovanje na izražaj gena, sintezu proteina, lokalizaciju signalnih proteina kao i otpuštanje molekula ključnih za funkcioniranje upalnih procesa (69, 70). S obzirom na funkciju, kemokini se svrstavaju u dvije kategorije: homeostatski i proupalni kemokini, s time da postoje znatna preklapanja jer velik broj kemokina pripada u obje kategorije.



Slika 4. Kemokini i kemokinski receptori. Shema prikazuje poznate kemokinske receptore pojedinačno prikazane u kružnicama poredanim u krug u obliku kotača. Na svakoj pripadajućoj žbici kotača navedeni su odgovarajući ligandi. Dio receptora veže više liganada po principu funkcionalne selektivnosti (označeno tamnijom bojom), dok su neki receptori specifični za pojedini ligand (svjetlije). Kemokini mogu biti klasificirani kao konstitutivni (homeostatski, označeni ljubičastom bojom) te inducibilni (proupalni, označeni narančastom bojom). Ta podjela nije apsolutna te je treba shvatiti kao pravilo s iznimkama.

K. U. Modificirno prema White GE, Iqbal AJ, Greaves DR. CC Chemokine Receptors in Inflammation. Pharmacological Reviews January 1, 2013, 65 (1) 47-89; Märkl F, Huynh D, Endres S, Kobold S. Utilizing chemokines in cancer immunotherapy. Trends Cancer. 2022 Aug;8(8):670-682.

Kemokini imaju ključnu ulogu u pokretanju i usmjeravanju upalnog procesa, a luče ih različite vrste krvnih stanica, uključujući leukocite te nekoliko vrsta tkivnih stanica (primjerice endotelne stanice, epitelne stanice, fibroblasti, β -stanice gušterače). Uobičajeni okidač za lučenje je odgovor na infekciju, odnosno bakterijske i virusne antigene ili odgovor na oštećenje tkiva (68). Djelovanje kemokina uključuje aktivaciju endotela i pojačanu adheziju cirkulirajućih leukocita, usmjerenu kemotaksiju prema kemokinskom gradijentu i aktivaciju ciljnih stanica, te susljednu imunosnu reakciju u zahvaćenom tkivu. Načelno, CXC – kemokini posreduju novačenje neutrofila i to poglavito kemokini CXCL1, CXCL5 i CXCL8, no imaju i sposobnost poticanja sinteze glikozaminoglikana te novačenje limfocita B, limfocita T i

monocita. Nadalje, kemokin CXCL12 ima angiogena svojstva, dok je učinak kemokina CXCL10 angiostatski (72). S druge strane, CC-kemokini posreduju prije svega kemotaksiju monocita, uz izuzetak kemokina CCL2 koji je jedan od glavnih čimbenika koji posreduje novačenje neutrofila. CC-kemokini kao i CXC-kemokini mogu sudjelovati i u novačenju limfocita (63, 67, 69, 70). Osim utjecaja na migraciju i aktivaciju stanica, kemokini imaju ulogu i u sazrijevanju limfocita, angiogenezi, imunosupresiji i drugim imunosnim procesima (67, 68).

S obzirom na to da kemokini pridonose patogenezi brojnih bolesti praćenih upalnim procesima koji vode poremećaju funkcije i strukture tkiva, a klinički se očituju kroničnim progresivnim tijekom, prepoznati su i kao ciljevi novijih terapijskih strategija (66-68).

1.4.1. Kemokini u razvoju šećerne bolesti tipa 1

Novijim istraživanjima sve je jasnija uloga upale u razvoju i tijeku šećerne bolesti tipa 1. Kemokini kao medijatori upalnog procesa imaju važnu ulogu i u razvoju i u kasnijem tijeku te bolesti te posreduju u nastanku endotelnog oštećenja koje vodi razvoju mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija. Same β -stanice gušterače imaju sposobnost lučenja različitih kemokina, a proces lučenja induciran je i potom pojačan izloženošću β -stanica upalnim signalima. Dok početni okidač koji aktivira autoimunosni proces usmjeren na β -stanice Langerhansovih otočića gušterače nije sasvim poznat, daljnji slijed događaja uključuje aktivaciju i lučenje citokina i kemokina iz tkivnih imunosnih stanica (prije svega makrofaga). Na to se nadovezuje novačenje dodatnih upalnih i imunosnih stanica (neutrofila, limfocita T) te njihova aktivacija, uz razvoj specifičnog imunosnog odgovora na antigene β -stanica, uz daljnje lučenje citokina i kemokina koji održavaju imunosni odgovor (66). Na taj se način kroz aktivaciju prirođenog, a potom i stečenog imunosnog odgovora te složenu interakciju niza upalnih stanica i njihovih produkata stvara začarani krug koji vodi selektivnoj infiltraciji upalnih i imunosnih stanica, te u konačnici posreduje uništenje β -stanica, odnosno njihovu funkcionalnu inhibiciju (66).

Dokazano je kako je upravo otpuštanje kemokina CCL2 i CXCL10 iz β -stanica odgovorno za pokretanje upalnog procesa, potičući ulazak upalnih stanica u tkivo gušterače (63). Kemokin CCL2 veže se za receptor CCR2, što se smatra ključnim u privlačenju monocita koji taj receptor izražavaju (73). Sve je više saznanja prema kojima i kemokin CCL4 ima važnu ulogu. Prema rezultatima istraživanja Kim i suradnika, čini se da aktivirani memorijski limfociti T koji izražavaju receptor CCR4 naseljavaju Langerhansove otočiće gušterače gdje

mijenjaju mikrookoliš β -stanica omogućujući novačenje drugih imunskih stanica koje izražavaju isti receptor (74). Uz aktivirane limfocite T, važnu ulogu imaju i predočne stanice poput limfocita B, dendritičkih stanica i makrofaga, a privlačenje upalnih i imunskih stanica smatra se jednim od ključnih koraka u započinjanju kaskade koja vodi autoimunskoj destruktiji β -stanica (74). Istovremeno, i kemokin CXCL10, vezanjem za receptor CXCR3, ima sposobnost usmjeriti migraciju aktiviranih i memorijskih limfocita T te stanica koje imaju ključnu ulogu u završnim fazama opisivanog autoimunskog procesa, poglavito stanica NK (prirodnoubilačkih stanica, prema engl. *natural killer cells*) (75, 76). Privučene upalne stanice u različitim fazama ovog procesa i same luče brojne citokine (IL-1, TNF- α , INF- γ) koji putem specifičnih receptora vode aktivaciji signalnih puteva (posredovanih jezgrinim čimbenikom kapa B, NF- κ B, prema engl. *nuclear factor kappa B* i STAT1, prema engl. *signal transducer and activator of transcription*). Spomenuti signalni putevi u konačnici povratno potiču lučenje kemokina i citokina iz β -stanica, poglavito kemokina CXCL10 koji nastavlja upalnu kaskadu, te istodobno smanjuju lučenje inzulina posredujuću funkcionalnu inhibiciju i uništenje β -stanica (63). Vrlo sličan proces koji vodi razvoju inzulitisa i destruktiji β -stanica odvija se i u organizmu pretilih osoba te se u završnom segmentu patofiziološkog procesa spajaju dva etiološki sasvim različita poremećaja.

1.4.2. Kemokini i pretilost

Sve je više dokaza da su i šećerna bolest i pretilost kronične upalne bolesti te da je kronično upalno stanje odgovorno za pokretanje cijelog niza procesa koje vode metaboličkim i vaskularnim komplikacijama.

U osoba sa šećernom bolešću, hiperglikemija je jedan od glavnih pokretača upalnih procesa. Istovremeno, u pretilih osoba prekomjerni unos energije vodi ekspanziji masnog tkiva i hipertrofiji adipocita uvjetujući njihovu disregulaciju i lučenje proupalnih citokina kao što su TNF- α , IL-1 β i IL-6. Spomenuti citokini pridonose smanjenju osjetljivosti na inzulin u primarnim ciljnim tkivima, uključujući jetru i skeletne mišiće, i to djelujući posredno, putem autokrinih i parakrinih upalnih signalnih puteva, ali i djelujući izravno na inzulinski receptor (77). Hipertrofični adipociti također luče i kemokine, posebice CCL2 i CCL5 te CXCL12 koji navode migraciju monocita u masno tkivo, koji se potom transformiraju u makrofage. Upravo makrofagi u masnom tkivu (ATM, prema engl. *adipose tissue macrophages*) koji izražavaju receptore CCR2 i CXCR4 predstavljaju ključan izvor proupalnih citokina i kemokina, koji

pojačavaju upalnu kaskadu održavajući upalni okoliš i smanjujući osjetljivost na inzulin (77) (Slika 3).

Smatra se da je upravo inzulinska rezistencija inducirana blagom upalnom reakcijom, koja dodatno potiče otpuštanje lipida, adipokina, proupalnih citokina i kemokina iz masnog tkiva, osnovni pokretač metaboličkih komplikacija u pretilih osoba.

Posljedica navedenog procesa je, među ostalim, i otpuštanje suviška slobodnih masnih kiselina u portalnu cirkulaciju te posljedično stvaranje masnih naslaga u jetri. Aktivacija tkivnih makrofaga u jetri, tzv. Kupfferovih stanica, ključan je korak koji vodi aktivaciji upalne kaskade uzrokujući razvoj steatoze i apoptoze hepatocita, privlačenje drugih upalnih stanica te, u konačnici, aktivaciju fibrogeneze. Steatoza jetre i steatohepatitis među prvim su laboratorijski uočljivim poremećajima u pretilih osoba, koje nerijetko nalazimo već u djece, i predstavljaju najčešću kroničnu bolest jetre suvremenog društva (77). U opisanom procesu značajnu ulogu ima kemokin CCL5, a opisana je i povezanost kemokina CCL5 s metaboličkim i regulatornim mehanizmima važnim u razvoju pretilost kao što su centralna regulacija energije, uzimanja hrane te regulacija temperature na razini hipotalamusa (65, 78).

1.4.3. Kemokini i krvožilne komplikacije

Metaboličke posljedice šećerne bolesti tipa 1, posebice hiperglikemija te u pretilih osoba dominantno hiperlipidemija, pogoduju razvoj endotelne disfunkcije, a potom i ateroskleroze već od dječje dobi.

Dokazano je da je kronično upalno stanje glavni patofiziološki pokretač promjena u stijenci krvnih žila koje vode razvoju ateroskleroze, odnosno stvaranju lezija bogatih lipidima, tzv. plakova. Kako je ranije opisano, u navedenim lezijama dolazi do kristalizacije kolesterola i oksidacije LDL-kolesterola, što dovodi do aktivacije proupalnih signala i pokretanja prirođenog i stečenog imunosnog odgovora u sloju intima arterijske stijenke (79) (Slika 1). Upalni signali posreduju novačenje upalnih stanica u plak u nastajanju, prije svega monocita i limfocita T. Imunosne stanice luče citokine INF- γ , IL-2 i IL-17, koji moduliraju lokalnu upalnu reakciju. Upalne stanice privučene u aterosklerotske plakove na površini izražavaju kemokinske receptore CCR5, CCR1 i CXCR3, sugerirajući ulogu njihovih liganada, među kojima su CCL5 i CXCL10, u upalnom procesu koji pogoduje razvoju plaka (79, 80). Kemokini CCL5 i CXCL10 putem receptora koje izražavaju aktivirani limfociti T pogoduju njihovom

nakupljanju u plaku transendotelijalnom dijapedezom. Sličnu ulogu imaju i MIF (prema eng. *macrophage migration inhibitory factors*) i CXCL12, koje nakon stimulacije oksidiranim LDL-kolesterolom luče endotelne stanice, stanice glatkih mišića te tkivni makrofagi. Ti kemokini djeluju putem receptora CXCR2 i CXCR4 na površini monocita i limfocita T (79, 81). U tom procesu važnu ulogu ima i kemokin CCL2, posebice u novačanju monocita u subendotelijalni prostor, koji ondje pridonose gomilanju „pjenušavih stanica“ (82).

Osim u razvoju ateroskleroze, odnosno bolesti velikih krvnih žila, upalni procesi posredovani kemokinima imaju važnu ulogu i u razvoju mikrovaskularnih promjena koje rezultiraju bolestima više organskih sustava, a kojima također pogoduju metabolički poremećaji koji nastaju na podlozi pretilosti i suboptimalno regulirane šećerne bolesti.

Tako na razini bubrega dolazi do ekspanzije mezangija, zadebljanja glomerularne bazalne membrane i glomerularne skleroze. Ulogu u tom procesu imaju kemokini CCL2 i CCL5, čije je lučenje, među ostalim, iz stanica proksimalnih tubula i sabirnih kanalića bubrega, stimulirano hiperglikemijom (82). Kemokin CCL2, kao i u drugim tkivima, pridonosi novačenju monocita putem receptora CCR2, održavanju lokalnog upalnog procesa, ekspresiji adhezijskih molekula, ali i angiogenezi i stvaranju ekstracelularnog matriksa (82-84). U konačnici dokazana je snažna korelacija između količine kemokina CCL2 izlučenog urinom i proteinurije u bolesnika sa šećernom bolešću (82).

Uloga kemokina CCL2 opisana je i u razvoju dijabetičke retinopatije, u promjenama koje zahvaćaju očnu pozadinu. U tom okruženju kemokine luče miofibroblasti i endotelne stanice retinalnih krvnih žila, a stimulirane su kemijskim promjenama u staklovini (82).

Uočeno je da bi i angiogeni učinci CXCL12 mogli imati poguban učinak na razvoj dijabetičke nefropatije i retinopatije (85), dok postoje i izvješća o zaštitnoj ulozi kompleksa CXCL12/CXCR4 u razvoju krvožilnih bolesti u pretilih osoba (86).

U osoba sa šećernom bolešću tipa 1 opisane su povišene koncentracije kemokina CXCL10 i CXCL11 te istovremeno smanjeno izražavanje njihovog receptora CXCR3 na površini limfocita upućujući na ulogu tih kemokina u remodeliranju endotela krvnih žila (66, 87). U pretilih je osoba također uočeno da bi kemokini CXCL10 i CXCL11 mogli imati ulogu u razvoju upale, inzulinske rezistencije i, konačno, ateroskleroze (65, 88, 89).

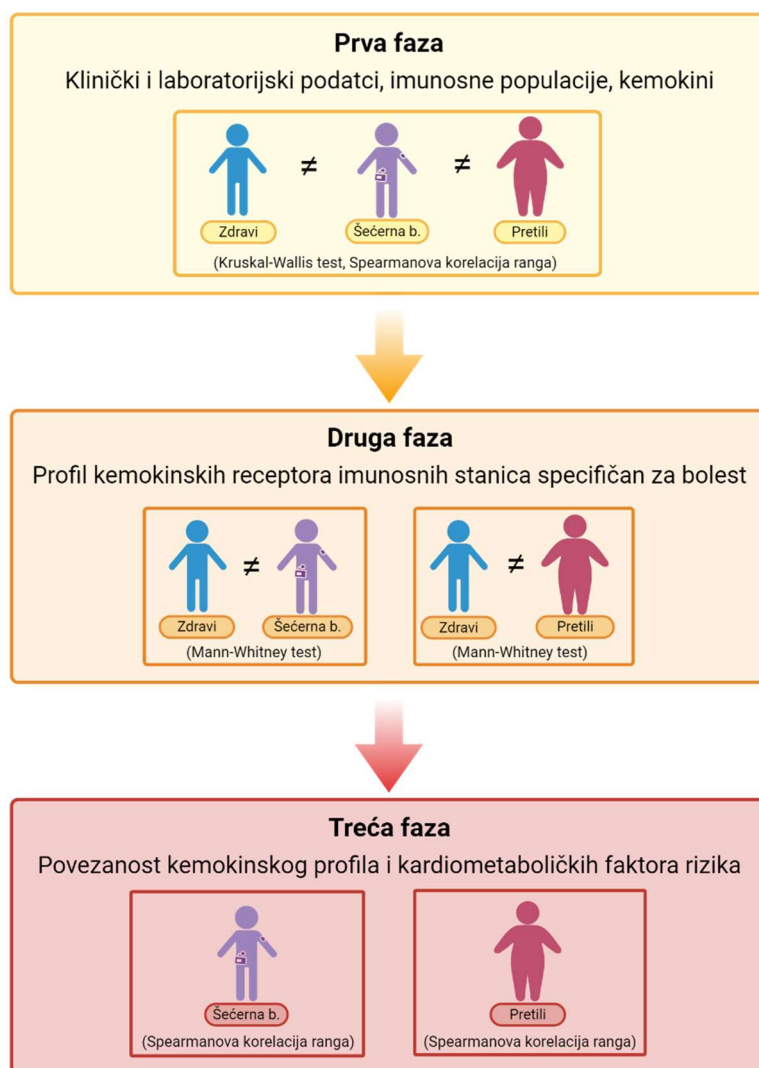
Pri tome se smatra da kemokini nisu ključni za održavanje autoimunosnog procesa, već pridonose upalnoj aktivnosti u podlozi razvoja krvožilnih komplikacija (90).

1.5. Svrha istraživanja

Kronična upalna reakcija blagog intenziteta posrednik je između metaboličkih poremećaja koji se razvijaju u djece sa šećernom bolešću tipa 1 i u pretile djece te posljedičnih krvožilnih komplikacija tih bolesti, a kemokini kao medijatori upale imaju važnu ulogu u spomenutim procesima. Znakove upalnog procesa kao i prve promjene koje upućuju na razvoj spomenutih komplikacija moguće je uočiti već u dječjoj dobi.

Ovim radom nastojali smo pridonijeti razumijevanju patofiziologije razvoja krvožilnih komplikacija u djece sa šećernom bolešću tipa 1 i u pretile djece, odnosno moguće uloge upalnog odgovora posredovanog kemokinima koji po svemu sudeći, započinje već u dječjoj dobi.

Kako bismo ostvarili gore navedeni cilj, istraživanje smo proveli kroz tri faze. U prvom smo dijelu usporedbom laboratorijskih parametara iz periferne krvi naših ispitanika nastojali pokazati razliku u koncentracijama kardiometaboličkih rizičnih čimbenika, upalnih molekula i imunosnih populacija te kemokina između zdravih ispitanika i skupina oboljele djece – djece sa šećernom bolešću tipa 1 i pretile djece. S obzirom da kemokini upravljaju migracijom upalnih stanica temeljem izražaja specifičnih kemokinskih receptora, definirali smo promjene u profilu kemokinskih receptora na površini upalnih i imunosnih stanica specifične za bolest. U konačnici smo, unutar pojedine skupine bolesnika, utvrdili povezanost kemokinskih liganada i kemokinskih receptora s kardiometaboličkim čimbenicima rizika i s prvim uočljivim znakovima krvožilnih komplikacija. Takva analiza ima potencijal identificirati eventualne markere ranih komplikacija, odnosno ciljeve budućih terapijskih intervencija (Slika 5).



Slika 5. Shema plana istraživanja. Podatci su prikupljeni te su analize provedene u tri faze. U prvom dijelu učinjena je usporedba kardiometaoboličkih čimbenika rizika, upalnih molekula i imunosnih populacija među sve tri skupine ispitanika (zdravi ispitanici, ispitanici sa šećernom bolešću i pretili ispitanici) korištenjem Kruskal-Wallis testa nakon kojeg je slijedila *post-hoc* analiza testom po Conoveru te korelacijom ranga po Spearmanu. Potom je uslijedila analiza profila plazmatskih kemokina i kemokinskih receptora izraženih na imunosnim populacijama, specifičnih za pojedinu bolest (šećernu bolest ili pretilost) u odnosu na kontrolne ispitanike korištenjem Mann-Whitney testa. U konačnici smo za svaku skupinu bolesnika nastojali utvrditi povezanost kemokinskih liganada i kemokinskih receptora s kardiometaoboličkim čimbenicima rizika i s prvim uočljivim znakovima krvožilnih komplikacija (krvni tlak i albuminurija) korištenjem korelacije ranga prema Spearmanu te identificirati različitosti odnosno preklapanja između tih entiteta. Shema je kreirana korištenjem programa BioRender.com

2. HIPOTEZA

Pojačano lučenje upalnih medijatora, posebice kemokina, uzrokuje kronično proupalno stanje koje je povezano s razvojem metaboličkih komplikacija šećerne bolesti tipa 1 i pretilosti u djece, što susljedno može dovesti do razvoja krvožilnih komplikacija.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Utvrditi povezanost plazmatskih koncentracija CC-kemokina (CCL2 i CCL5) i CXC-kemokina (CXCL10, CXCL11 i CXCL12) i izražavanje odgovarajućih kemokinskih receptora s vrijednostima metaboličkih parametara koji čine čimbenike rizika za razvoj krvožilnih komplikacija u djece sa šećernom bolešću tipa 1 i u pretile djece.

3.2. Specifični ciljevi

Opći cilj detaljno je istražen kroz sljedeće specifične ciljeve:

1. Odrediti metaboličke parametre koji predstavljaju čimbenike rizika za razvoj krvožilnih komplikacija u djece sa šećernom bolešću tipa 1, u pretile djece i zdravih ispitanika (parametre glikemije, lipidogram, krvni tlak, pokazatelj inzulinske rezistencije u pretilih – HOMA IR (prema engl. *homeostatic model assessment for insulin resistance*), znakove jetrene lezije – koncentracije aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT)) te analizirati povezanost s kliničkim značajkama (dob, spol, trajanje šećerne bolesti, antropometrijski podatci, stupanj pubertetskog razvoja).
2. Odrediti opće pokazatelje upale (C-reaktivni protein (CRP), fibrinogen) za procjenu upalne aktivnosti u djece sa šećernom bolešću tipa 1, u pretile djece te u zdravih ispitanika.
3. Odrediti plazmatske koncentracije odabranih kemokina (CCL2, CCL5, CXCL10, CXCL11 i CXCL12) u djece sa šećernom bolešću tipa 1, u pretile djece te u zdravih ispitanika.
4. Odrediti izražaj odgovarajućih kemokinskih receptora na površini mononuklearnih stanica periferne krvi (CCR2 za CCL2; CCR4 za CCL5, CXCR3 za CXCL10 i CXCL11 te CXCR4 za CXCL12) u djece sa šećernom bolešću tipa 1 i u pretile djece te ih usporediti s vrijednostima u kontrolnoj skupini.
5. Ispitati korelaciju koncentracija ispitivanih kemokina i izražavanja kemokinskih receptora s općim upalnim biljezima i s metaboličkim parametrima u pojedinoj bolesti.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

U istraživanje smo uključili 94 ispitanika dobi 12,1-17,9 godina (medijan 15,2 godina [interkvartilni raspon (IQR) 14,0 – 16,8]), od toga 52 muških (55,3%) i 42 ženskih (44,7%), podijeljenih u tri skupine: zdravi kontrolni ispitanici, djeca i adolescenti sa šećernom bolešću tipa 1 te pretila djeca i adolescenti. Skupine ispitanika usklađene su prema dobi i spolu te obuhvaćaju djecu i adolescente koji su se liječili i kontrolirali u Klinici za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb (KBC Zagreb). Zdrave ispitanike odgovarajuće dobi i spola regrutirali smo među bolesnicima pregledanim ili kontroliranim u Klinici za pedijatriju, KBC Zagreb pod sumnjom na neupalnu bolest, u kojih učinjenom obradom nije potvrđeno patološko stanje. Iz ispitivanja smo isključili sve bolesnike s drugom akutnom ili kroničnom bolešću te bolesnike u kojih je primijenjeno liječenje za koje je poznato da može djelovati na koncentracije upalnih medijatora (nesteroidni protuupalni lijekovi, glukokortikoidi, imunomodulatorna terapija i sl.). Prije uključivanja u istraživanje roditelji ili skrbnici ispitanika pismeno su i usmeno upućeni u pojedinosti istraživanja te su potpisali informirani pristanak. Prije početka istraživanja ishodene su dopusnice nadležnih Etičkih povjerenstava: Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (641-01/18-02/01) i Etičkog povjerenstva KBC Zagreb (02/21 AG).

Ispitanici su prema kliničkim značajkama podijeljeni u sljedeće skupine (Tablica 2):

- **Kontrolna skupina** (zdravi ispitanici): 29 ispitanika dobi 13,0 – 17,9 godina, medijan 15,6 [IQR 14,2 – 16,9] godina, od kojih je 14 muških (48,3%) i 15 ženskih (51,7%).
- **Bolesnici sa šećernom bolešću tipa 1**, trajanja najmanje 5 godina: 31 ispitanik, dobi 12,3 – 17,9 godina, medijan 15,4 [IQR 14,4 – 17,0] godina, od kojih je 19 muških (61,3%) i 12 ženskih (38,7%).
- **Pretila djeca**, ITM > 95. centile (ITM izražen kao vrijednost standardne devijacije, ITM-SDS > 1,64 SD): 34 ispitanika dobi 12,1 – 17,6 godina, medijan 14,3 [IQR 13,7 – 16,7] godina, od kojih je 19 muških (55,9%) i 15 ženskih (44,1%).

Tablica 2. Osnovna demografska obilježja ispitanika i raspodjela prema skupinama

Skupina	Broj ispitanika	Dob ispitanika (godine)			Spol (ženski/muški)
	N (%)	Medijan	IQR	Raspon dobi	N (%)
KS	29 (30,8)	15,6	14,2 – 16,9	13,0 – 17,9	14/15 (48,3/51,7)
ŠB1	31 (33,0)	15,4	14,4 – 17,0	12,3 – 17,9	19/12 (61,3/38,7)
PRT	34 (36,2)	14,3	14,3 – 16,7	12,1 – 17,6	19/15 (55,9/44,1)
Ukupno	94 (100)	15,2	14,0 – 16,8	12,1 – 17,9	52/42 (55,3/44,7)

Skupine se nisu međusobno razlikovale po dobi ni spolu. KS – kontrolna skupina; ŠB1 – šećerna bolest tipa 1; PRT – pretila djeca; N – broj; IQR – interkvartilni raspon

Uključeni su ispitanici kojima je dijagnoza šećerne bolesti tipa 1 odnosno pretilosti postavljena u skladu s važećim kriterijima (91, 92). Kriteriji za šećernu bolest tipa 1 uključuju: klinički simptomi šećerne bolesti i koncentracija glukoze u krvi iznad 11,1 mmol/L, odnosno koncentracija glukoze u krvi na tašte iznad 7,0 mmol/L ili koncentracija glukoze u krvi dva sata nakon opterećenja glukozom u oralnom testu opterećenja glukozom iznad 11,1 mmol/L (91) te prisutnost protutijela na barem jedan od specifičnih antigena: ICA (prema engl. *islet cell antibodies*), GAD (prema engl. *glutamic acid decarboxylase*) ili IA-2 (prema engl. *tyrosine phosphatase-related islet antigen 2*).

Kriteriji za pretilost uključuju vrijednosti ITM veće od 95. centile za dob i spol prema referentnim krivuljama rasta (odgovara vrijednostima ITM-SDS većim od 1,64 SD) (92). Kao referentne krivulje rasta korištene su krivulje Centra za kontrolu i prevenciju bolesti Sjedinjenih Američkih Država (*Centers for Disease Control and Prevention, CDC*), dostupno na: <https://www.cdc.gov/growthcharts/cdc-charts.htm>. Radi preciznije usporedbe među skupinama vrijednosti ITM izražene su kao ITM-SDS (93).

4.2. Metode

4.2.1. Klinički postupci

Kliničkim postupcima koji su uključivali razgovor, klinički pregled, pregled medicinske dokumentacije i rutinsku laboratorijsku obradu, prikupljeni su sljedeći podatci:

1. **Anamnestički podatci:** dob, trajanje bolesti, doza inzulina, pojava kroničnih komplikacija bolesti, prisutnost drugih bolesti, uzimanje lijekova;
2. **Klinički podatci:** spol, antropometrijski podatci, stupanj spolnog razvoja po Tanneru, krvni tlak;
3. **Laboratorijski nalazi:**
 - upalni pokazatelji: CRP, fibrinogen;
 - metabolički parametri: stupanj hiperglikemije (koncentracija glukoze u plazmi, udio HbA1c), stupanj inzulinske rezistencije u pretilih ispitanika (izraženo indeksom inzulinske rezistencije, HOMA-IR), lipidogram (ukupni kolesterol, HDL-kolesterol i LDL-kolesterol, trigliceridi), jetrene aminotransferaze: AST i ALT;
 - stupanj albuminurije (omjer albumina i kreatinina u dva uzorka prvog jutarnjeg urina, a ukoliko je u jednom od uzoraka izmjerena pojačana albuminurija, uzet je i treći uzorak urina, izračunata je i prikazana srednja vrijednost).

Krv za navedene pretrage uzorkovana je ujutro između 8:30h i 11:30h, nakon prekonocnog gladovanja od minimalno 8 sati.

Laboratorijska analiza spomenutih rutinskih biokemijskih pretraga učinjena je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb.

4.2.2. Laboratorijski postupci

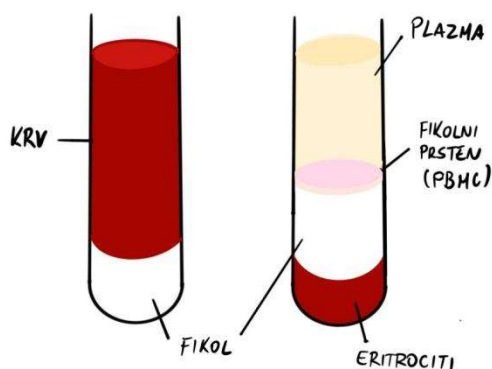
Uzorci periferne krvi (2-3 ml) uzeti su venepunkcijom, u isto vrijeme kada su uzimani uzorci periferne krvi za rutinsku laboratorijsku obradu (radi poštode ispitanika). Uzorci su prikupljeni u epruvetu s antikoagulansom EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina, prema engl.

ethylenediaminetetraacetic acid) te su, u rashladnom mediju, odmah dostavljeni u Laboratorij za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga i Zavoda za fiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi obrade (izolacija plazme i mononuklearnih stanica periferne krvi) i analize uzoraka (određivanje koncentracije kemokina pomoću protočne citometrije korištenjem mikrokuglica obloženih protutijelima i metodom ELISA (kolorimetrijski imunoenzimski postupak, prema engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*), određivanje imunofenotipova mononuklearnih stanica periferne krvi i izražaja kemokinskih receptora protočnom citometrijom).

4.2.2.1. Izolacija plazme i mononuklearnih stanica periferne krvi

Plazma je od stanica periferne krvi odvojena metodom razdvajanja na gradijentu gustoće. Ukratko, ukupna količina krvi polagano je nadslojavana na otopinu fikola (Histopaque, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, SAD) volumena koji je odgovarao volumenu krvi. Nakon centrifugiranja na 600x g tijekom 20 minuta razdvojile su se tri faze, od kojih se na površini nalazi plazma (Slika 6). Plazma je odvojena i pohranjena na -20°C do analize protočno-citometrijskom metodom, odnosno metodom ELISA za određivanje koncentracije kemokina.

Mononuklearne stanice periferne krvi izolirane su iz iste epruvete nakon razdvajanja na gradijentu gustoće. Mononuklearne stanice su nakon razdvajanja prisutne u tzv. fikolnom prstenu te su pažljivo izdvojene pipetom u novu epruvetu (Slika 6). Stanice su dva puta isprane u fosfatnim puferom puferiranoj fiziološkoj otopini (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*), izbrojane u Bürker-Türkovoj komorici uz isključivanje mrtvih stanica bojenjem tripanskim plavilom i pripremljene za imunofenotipizaciju.

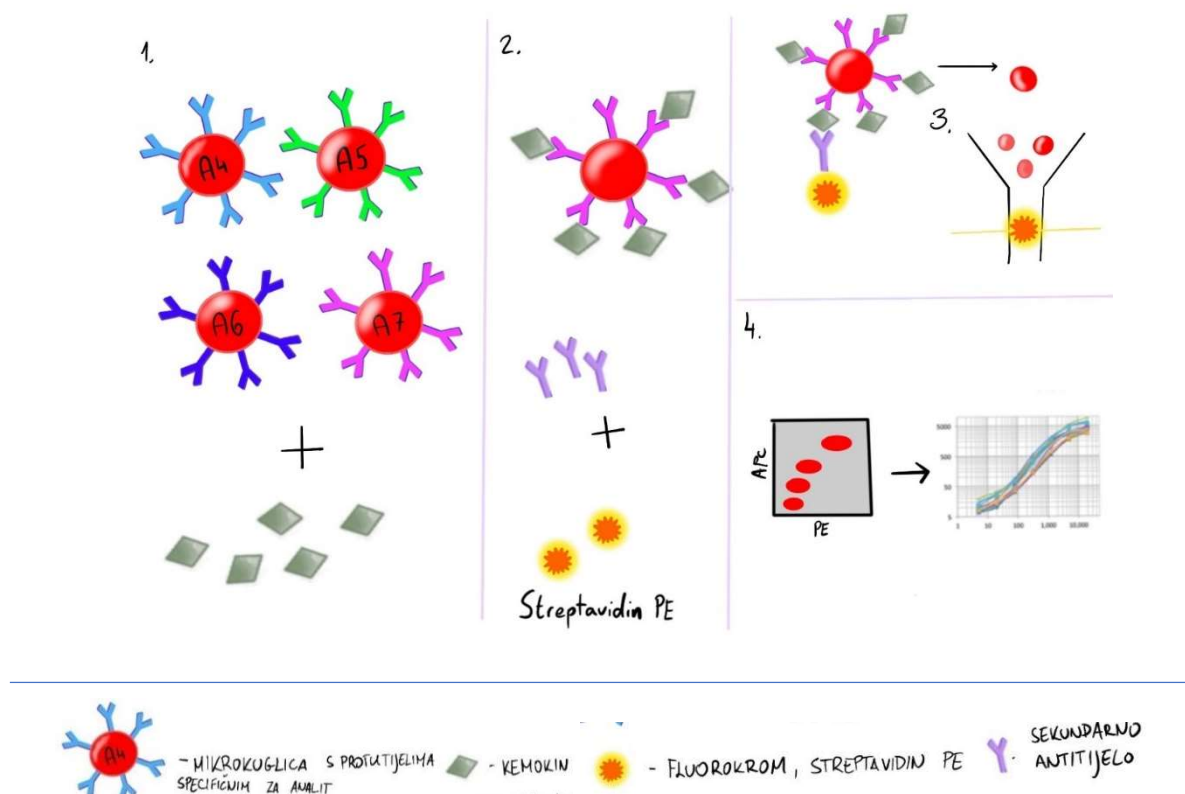


Slika 6. Odvajanje plazme i mononuklearnih stanica periferne krvi na gradijentu fikola. Lijeva epruveta sadrži uzorak periferne krvi nadslojene na otopinu fikola. Desna epruveta sadrži tri sloja nastala u gradijentu fikola nakon nadslojavanja uzorka (Histopaque, Sigma, St. Louis, USA; gustoća 1,077 g/mL) i nakon vrtnje tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi brzinom 600 x g. PBMC – mononuklearne stanice periferne krvi, prema engl. *peripheral blood mononuclear cells*. K.U. Modificirano prema: <http://os.bio-protocol.org/>

4.2.2.2. Određivanje koncentracije kemokina pomoću mikrokuglica obloženih protutijelima

U uzorcima plazme odredili smo koncentracije CC-kemokina (CCL2, CCL5) i CXC-kemokina (CXCL10 i CXCL11) metodom protočne citometrije pomoću mikrokuglica obloženih protutijelima korištenjem komercijalnog seta kemikalija BioLegend LEGENDplex™ (Human Proinflammatory Chemokine Mix and Match Subpanel cytometric bead-based assay, Biolegend, San Diego, SAD). Metoda bazirana na mikrokuglicama obloženim protutijelima, BioLegend LEGENDplex™, podrazumijeva korištenje protočne citometrije kojom se analizira veličina i fluorescencija mikrokuglica vezanih na protutijelo specifično za pojedini kemokin. Ovom metodom određene su koncentracije kemokina CCL2, CCL5, CXCL10 i CXCL11, prema uputama proizvođača. Ukratko, uzorci plazme najprije su inkubirani s reagensom (kuglice obložene protutijelima specifičnim za svaki od traženih analita koje se razlikuju na temelju veličine i intenziteta fluorescencije alofikocijanina (APC, prema engl. *allophycocyanin*). Nakon ispiranja otopina je inkubirana s detekcijskim reagensom koji sadrži anti-kemokinska protutijela konjugirana s biotinom, te na kraju s otopinom koja sadrži drugi fluorokrom, streptavidin – fikoeritrin (PE, prema engl. *phycoerythrin*), što omogućuje određivanje koncentracije analita na temelju intenziteta fluorescencije PE. Nakon još jednog ispiranja, kompleksi kuglica, analita i detekcijskih protutijela su analizirani koristeći protočni

citometar BD FACSaria Ilu (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD). Mjerenje i analiza koncentracija kemokina učinjeni su koristeći program LEGENDplex™ (LEGENDplex Data Analysis Software, BioLegend), služeći se krivuljama standarda dobivenim analizom unaprijed pripremljenih koncentracija kemokina u komercijalnom setu (Slika 7).



Slika 7. Princip određivanja koncentracije kemokina metodom BioLegend LEGENDplex™ Uzorci plazme inkubiraju se s reagensom (1) – smjesa mikrokuglica obloženih protutijelima specifičnim za svaki od traženih analita, a koje se razlikuju na temelju veličine i intenziteta fluorescencije (kuglice imaju intrinzičnu APC-fluorescenciju). Nakon ispiranja otopina je inkubirana s detekcijskim reagensom koji sadrži sekundarna protutijela konjugirana s biotinom, potom vezana za drugi fluorokrom, streptavidin-PE (2), što omogućuje određivanje koncentracije analita na temelju intenziteta fluorescencije PE. Nakon još jednog ispiranja, kompleksi kuglica, analita i detekcijskih protutijela su analizirani koristeći protočni citometar BD FACSaria Ilu (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD) (3). Mjerenje i analiza koncentracija kemokina učinjeni su koristeći program LEGENDplex™ (LEGENDplex Data Analysis Software, BioLegend) (4). Ovom metodom određene su koncentracije kemokina CCL2, CCL5, CXCL10 i CXCL11. APC – alofikocijanin, prema engl. *allophycocyanin*; PE – fikoeritrin, prema engl. *phycoerythrin*; CXCL - kemokinski ligand s C-X-C motivom; CCL - kemokinski ligand s C-C motivom K.U. Modificirano prema <https://www.biolegend.com/de-de/immunoassays/legendplex>

4.2.2.3. Određivanje koncentracije kemokina metodom ELISA

Koncentraciju CXCL12 u plazmi odredili smo postupkom ELISA koristeći komercijalni set kemikalija (Human CXCL12/SDF-1a, Quantikine Immunoassay; R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD), prema uputama proizvođača. Ukratko, uzorke plazme smo dodali na pločicu prekrivenu monoklonskim protutijelom specifičnim za CXCL12. Nakon inkubacije tijekom 2h uklonili smo uzorke i isprali zdenice puferom te dodali drugo protutijelo specifično za CXCL12 konjugirano s peroksidazom. Nakon ponovnog ispiranja dodali smo otopinu koja sadrži supstrat tetrametilbenzidin (TMB), kojeg peroksidaza pretvara u obojeni produkt, a jačina boje razmjerna je koncentraciji CXCL12 u uzorku plazme. Optičku gustoću odredili smo na čitaču za mikropločice (GloMax Explorer Multimed Microplate Reader, Promega, Madison, WI, SAD) uz ekscitacijsku valnu duljinu 450 nm. Koncentraciju u uzorcima odredili smo prema standardnoj krivulji dobivenoj serijskim razrjeđivanjem otopine standarda u komercijalnom setu.

4.2.2.4. Imunofenotipizacija mononuklearnih stanica periferne krvi i određivanje izražaja kemokinskih receptora

Imunofenotipizacija mononuklearnih stanica periferne krvi učinjena je metodom protočne citometrije. Stanice su obilježene koristeći smjesu komercijalno dostupnih monoklonalnih protutijela na pan-leukocitni biljeg (anti-CD45, prema engl. *cluster of differentiation 45*) te specifične stanične biljege osnovnih loza imunosnih stanica periferne krvi: anti-CD3 za limfocite T, anti-CD19 za limfocite B i anti-CD14 za monocite, tvrtke BioLegend (Tablica 3, Slika 8).

Na subpopulacijama mononuklearnih stanica, potom je istom metodom analizirano izražavanje receptora za kemokine (CCR2, CCR4, CXCR3 i CXCR4), koristeći smjesu komercijalno dostupnih monoklonskih protutijela (anti-CD45 PerCP, anti-CD3 Alexa Fluor® 488, anti-CD19 APC/Fire™ 750 i anti-CD14 PE/Cyanine 7) uz protutijela specifična za ispitivane receptore podijeljene u dva panela: anti-CCR2 PE i anti-CCR4 APC ili anti-CXCR3 APC i anti-CXCR4 PE. U istraživanju su korištena monoklonska protutijela proizvođača eBioscience (San Diego, CA, SAD), R&D Systems (Bio-Techne, Abingdon, UK za CCR2) i BioLegend prema priloženim uputama (Tablica 3). Ukratko, suspenzija stanica (2 milijuna stanica) najprije je inkubirana u otopini za blokiranje Fc-receptora (Human TruTsain, BioLegend) tijekom 10 minuta, a potom je dodana smjesa specifičnih protutijela (u razrjeđenju

1:50) i inkubirana na ledu tijekom 40 minuta. Nakon inkubacije stanice su isprane otopinom PBS uz 2% fetalnog telećeg seruma. Po ispiranju stanice su resuspendirane u istom puferu te analizirane koristeći strategiju u kojoj su najprije isključene dvostruke stanice, zatim su uokvireni samo leukociti (CD45⁺), te odvojeno prikazane populacije limfocita T (CD3⁺), limfocita B (CD19⁺) i monocita (CD14⁺), te je na njima dalje analizirana izraženost kemokinskih receptora (Slika 8). Ograde za izraženost pojedinog biljega postavljene su na temelju neoznačenih stanica i kontrolnih uzoraka u kojima je pri označavanju izostavljen pojedini fluorokrom („fluorescence minus one control“).

Za imunofenotipizaciju mononuklearnih stanica korišten je protočni citometar Invitrogen Attune (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), a dobiveni podatci analizirani su pomoću softvera FlowJo (FlowJo, LLC, Ashland, OR, SAD) (Slika 8).

Tablica 3. Monoklonska protutijela korištena za imunofenotipizaciju mononuklearnih stanica i određivanje izražaja receptora za kemokine metodom protočne citometrije

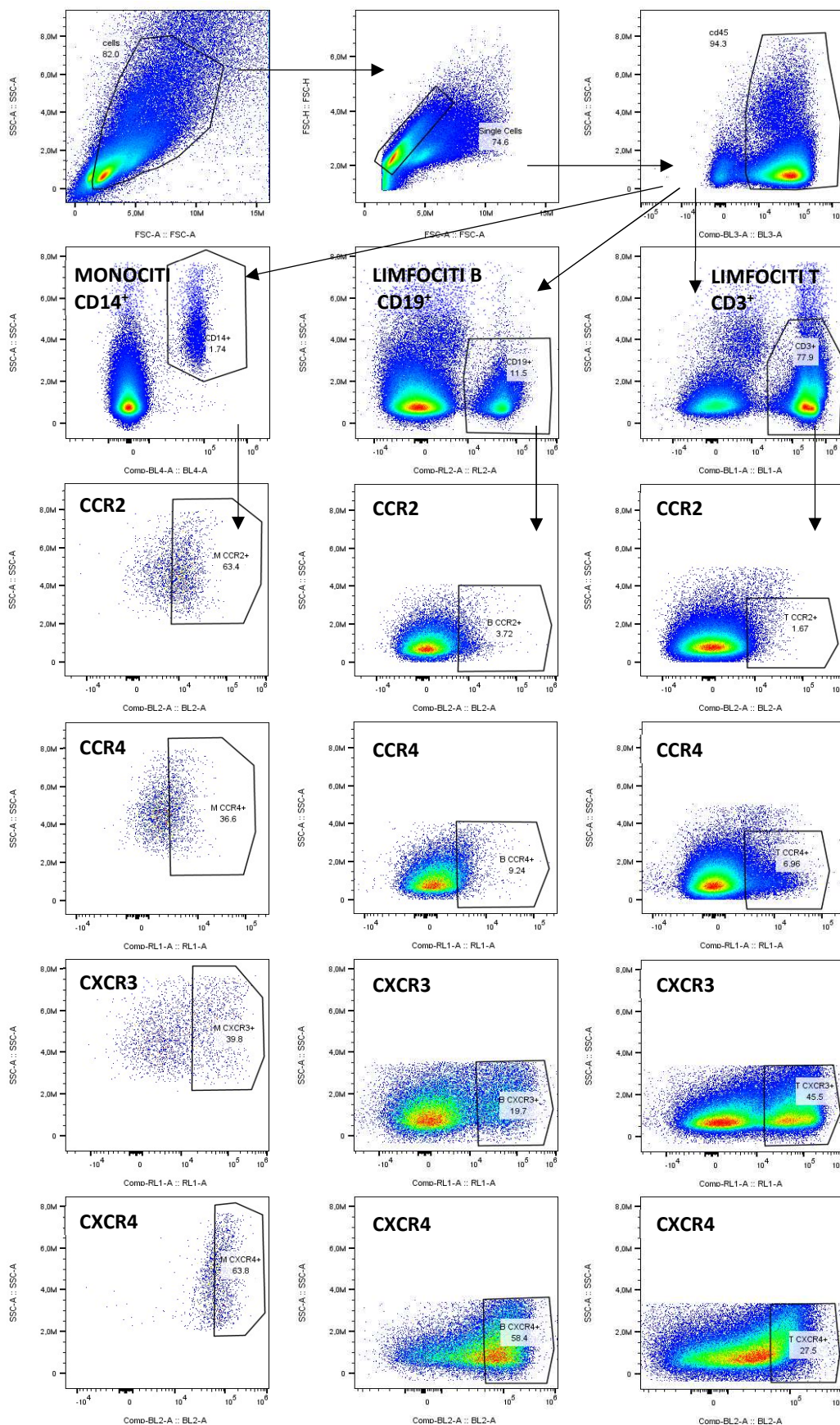
Biljeg	Klon	Fluorokrom	Proizvođač	Kataloški broj
CD3	OKT3	Alexa Fluor® 488	BioLegend (San Diego, CA, USA)	317310
CD14	63D3	PE/Cyanine7	BioLegend (San Diego, CA, USA)	367112
CD19	SJ25C1	APC/Fire™ 750	BioLegend (San Diego, CA, USA)	363030
CD45	HI30	PerCP	BioLegend (San Diego, CA, USA)	304026
CCR2 (CD192)	48607	PE	R&D Systems (Bio-Techne, Abingdon, UK)	FAB151P
CCR4 (CD194)	D8SEE	APC	eBiosciences (San Diego, CA, USA)	17-1949-42
CXCR3 (CD183)	G025H7	APC	BioLegend (San Diego, CA, USA)	353708
CXCR4 (CD184)	1265	PE	BioLegend (San Diego, CA, USA)	306506

CD – stanični biljeg, prema engl. *cluster of differentiation*; CXCR - receptor za kemokinski ligand s C-X-C motivom; CCR - receptor za kemokinski ligand s C-C motivom; PE – fikoeritrin, prema engl. *phycoerythrin*; APC – alofokocijanin, prema engl. *allophycocyanin*; PerCP – peridin-klorofil-cijanin, prema engl. *peridinin-chlorophyll-cyanine*

PBMC

POPULACIJE

IZRAŽENOST KEMOKINSKIH RECEPTORA



Slika 8. Postupak određivanja izraženosti kemokinskih receptora na populacijama mononuklearnih stanica periferne krvi. Analiza je provedena na način da je najprije označena populacija mononukleara, odvojeno od staničnog debrisa na temelju veličine i kompleksnosti (FSC/SSC), zatim su odstranjene dvostruke stanice (FCS-A/FCS-H) i izdvojena je populacija leukocita (CD45⁺). Pojedine imunosne populacije identificirane su na temelju izražaja biljega specifičnog za lozu: monocita (CD14⁺), limfocita T (CD3⁺) i limfocita B (CD19⁺). Na tim populacijama dalje je analizirana izraženost kemokinskih receptora, koja je prikazana kao postotak unutar pojedine loze. Ograde za izraženost pojedinog biljega postavljene su na temelju neoznačenih stanica i kontrolnih uzoraka u kojima je pri označavanju izostavljen pojedini fluorokrom („fluorescence minus one control“). PBMC – mononuklearne stanice periferne krvi, prema engl. *peripheral blood mononuclear cells*; CD – stanični biljeg, prema engl. *cluster of differentiation*; CXCR – receptor za kemokinski ligand s C-X-C motivom; CCR – receptor za kemokinski ligand s C-C motivom; FSC – prema engl. *forward scatter*; SSC – prema engl. *side scatter*.

4.3. Statistička analiza

Vrijednosti varijabli mjerenih nominalnom i ordinalnom ljestvicom prikazane su apsolutnom vrijednošću i postotkom. Razdioba vrijednosti kontinuiranih varijabli testirana je Kolgomorov-Smirnovljevom testom. S obzirom da većina varijabli nije slijedila normalnu raspodjelu, a u svrhu postizanja lakše razumljivosti i komparabilnosti sve su varijable navedene kao medijan i IQR.

Statističko testiranje razlika među skupinama ispitanika provedeno je hi-kvadrat testom kod nominalnih varijabli. Kod ordinalnih varijabli i kontinuiranih varijabli korišteni su odgovarajući neparametrijski testovi – Mann-Whitneyjev test za usporedbu dviju skupina, a Kruskal-Wallis ANOVA za usporedbu više skupina (uz Conover post-hoc test). Za spomenute analize korišten je program MedCalc, verzija 19.1.6 (MedCalc Software Ltd., Ostend, Belgium). Povezanost između dviju kontinuiranih varijabli ispitana je Spearmanovim testom korelacije ranga i prikazana koeficijentom korelacije rho (ρ). Za analizu korelacija korišten je program SPSS, verzija 26 (IBM Corp, Armonk, NY, SAD)

Za razinu statističke značajnosti (vrijednost α) odredili smo $p < 0,05$.

5. REZULTATI

Nakon prikaza osnovnih demografskih podataka naših ispitanika i osnovnih značajki pojedinih skupina u ovom istraživanju, prikazat ćemo usporedbu kardiometaboličkih parametara koji predstavljaju čimbenike rizika za razvoj krvožilnih komplikacija šećerne bolesti tipa 1 i pretilosti. Prikazat ćemo kako su kardiometabolički čimbenici rizika značajno izraženiji u skupinama bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu te kako su u tim skupinama prisutni u značajnom udjelu već od dječje dobi. Uz navedeno, u obje skupine ispitanika postoji blagi, ali komercijalnim laboratorijskim pretragama uočljiv upalni proces, kao i značajna povezanost kardiometaboličkih čimbenika rizika s promatranim parametrima upale. Nakon toga ćemo ići korak dalje u razotkrivanju upalnog stanja u skupinama oboljelih od šećerne bolesti i u pretilih, te ćemo prikazati različitu zastupljenost populacija mononuklearnih stanica periferne krvi u svakoj pojedinoj bolesti, a potom prikazati i razlike u mjerenim plazmatskim koncentracijama kemokina i udjelima pojedinih kemokinskih receptora među skupinama ispitanika. U konačnici ćemo prikazati za bolest specifične obrasce povezanosti pojedinih kemokinskih liganada i kemokinskih receptora s kardiometaboličkim čimbenicima rizika (Slika 5).

5.1. Osnovni demografski podatci ispitanika

U istraživanje je uključeno ukupno 94 ispitanika dobi 12,1 do 17,9 godina, 52 dječaka (55,3%) i 42 djevojčice (44,7%) podijeljenih u tri skupine sa sljedećim značajkama (Tablica 2):

- Kontrolna skupina – 29 ispitanika u dobi od 13,0 do 17,9 godina, medijan 15,6 [IQR 14,2 – 16,9] godina, od kojih je 14 dječaka (48,3%) i 15 djevojčica (51,7%). U toj je skupini ispitanika medijan vrijednosti ITM-SDS iznosio 0,10 [IQR -0,68 – 0,55] SD, dok je medijan koncentracije glukoze u krvi natašte bio 4.70 [IQR 4.38 – 4.80] mmol/L, a HOMA-IR 1,88 [IQR 1,37 – 2,86];
- Djeca i adolescenti sa šećernom bolešću tipa 1 – 31 ispitanik u dobi od 12,3 do 17,9 godina, medijan 15,4 [IQR 14,4 – 17,0] godina, od kojih je 19 dječaka (61,3%) i 12 djevojčica (38,7%). Medijan trajanja šećerne bolesti u naših ispitanika bilo je 10,0 [IQR

6,6-11,8] godina, medijan vrijednosti ITM-SDS bio je -0,12 [IQR -0,69 – 0,68] SD. Prosječna vrijednosti HbA1c u djece sa šećernom bolešću bila je 8,42%,

- Pretila djeca i adolescenti – 34 ispitanika u dobi od 12,1 do 17,6 godina, medijan 14,3 [IQR 13,7 – 16,7] godina, od kojih je 19 dječaka (55,9%) i 15 djevojčica (44,1%). Medijan vrijednosti ITM u pretile djece iznosio je 34,15 [IQR 32,8 – 38,2] kg/m², što odgovara medijanu vrijednosti ITM-SDS +2,35 [IQR 2,16 – 2,52] SD, dok je medijan koncentracije glukoze u krvi bio 4.70 [IQR 4.40 – 5.00] mmol/L, a medijan vrijednosti HOMA-IR 4.32 [IQR 2.99 – 6.20].

Skupine ispitanika nisu se statistički značajno razlikovale prema dobi i spolu.

5.2. Metabolički parametri u djece sa šećernom bolešću tipa 1, u pretile djece i u zdravih ispitanika

Ispitivane su vrijednosti metaboličkih parametara za koje je poznato da predstavljaju čimbenike rizika za razvoj krvožilnih komplikacija u djece sa šećernom bolešću i u pretile djece te su dobiveni rezultati uspoređeni s vrijednostima u skupini zdravih ispitanika (Tablica 4).

Najviše vrijednosti većine kardiometaboličkih čimbenika rizika nađene su u pretile djece uključujući vrijednosti ITM, sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka, koncentracije triglicerida, koncentracije enzima ALT, vrijednosti HOMA-IR te albuminurije. Skupina djece sa šećernom bolešću imala je najvišu koncentraciju ukupnog kolesterola, a i vrijednosti ostalih parametara lipidograma bile su povišene u odnosu na zdrave ispitanike.

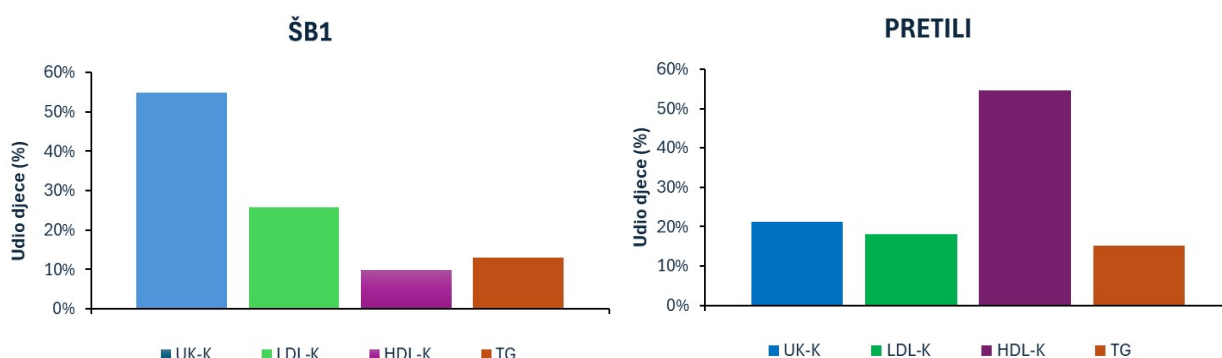
Medijan vrijednosti ITM-SDS u pretile djece iznosio je 2,35 [IQR 2,16 – 2,52] SD i bio je statistički značajno viši u odnosu na skupinu ispitanika sa šećernom bolešću te u odnosu na zdrave ispitanike (Tablica 4). Djeca i adolescenti sa šećernom bolešću imali su vrijednosti ITM-SDS usporedive djeci i adolescentima u kontrolnoj skupini.

Tablica 4. Usporedba čimbenika rizika za razvoj krvožilnih komplikacija između kontrolnih ispitanika, djece koja boluju od šećerne bolesti tipa 1 i pretile djece

Varijable	Kontrolna skupina (n=29)	ŠB1 (n=31)	Pretili (n=34)	p [‡]
Dob (godine)	15,0 [14,0 – 17,0]	15,0 [14,0 – 17,0]	14,0 [14,0 – 16,3]	0,115
Spol (ženski/muški)	14/15 (48,3/51,7)	19/12 (61,3/38,7)	19/15 (55,9/44,1)	0,596
ITM-SDS (SD)	0,10 [-0,68 – 0,55]	-0,12 [-0,69 – 0,68]	2,35 [2,16 – 2,52]	<0,001
SKT (mmHg)	120,0 [110,0 – 130,0]	125,0 [115,0 – 133,5]	130,0 [114,5 – 145,0]	0,079
DKT (mmHg)	74,0 [66,0 – 82,0]	75,0 [69,3 – 83,8]	80,0 [71,5 – 90,0]	0,037
UK-K (mmol/L)	3,80 [3,30 – 4,10]	4,40 [3,93 – 4,78]	3,90 [3,50 – 4,20]	0,003
LDL-K (mmol/L)	1,89 [1,59 – 2,20]	2,26 [1,89 – 2,60]	2,20 [1,94 – 2,44]	0,023
HDL-K (mmol/L)	1,32 [1,20 – 1,59]	1,47 [1,28 – 1,76]	1,08 [0,92 – 1,20]	<0,001
TG (mmol/L)	0,77 [0,62 – 0,97]	1,00 [0,76 – 1,30]	1,13 [0,88 – 1,55]	<0,001
HOMA-IR	1,88 [1,57 – 2,86]	N/A	4,32 [2,99 – 6,20]	<0,001
HbA1c (%)	N/A	8,20 [7,43 – 9,20]	N/A	
GUK (mmol/L)	4,70 [4,38 – 4,80]	N/A	4,70 [4,40 – 5,00]	0,430
INS (μIU/mL)	9,40 [7,80 – 13,73]	N/A	19,65 [14,90 – 27,40]	<0,001
AST (U/L)	21,00 [15,75 – 22,25]	21,0 [18,0 – 25,00]	20,50 [18,0 – 24,00]	0,364
ALT (U/L)	13,00 [11,00 – 17,00]	16,00 [12,25 – 20,50]	21,50 [14,00 – 33,00]	<0,001
AST/ALT < 1	3 (10,3%)	5 (16,1%)	16 (47,1%)	0,001
ACR (mg/mmol)	0,25 [0,0 – 0,40]	0,20 [0,0 – 0,38]	0,50 [0,28 – 0,80]	0,004

Vrijednosti su navedene kao medijan i interkvartilni raspon osim omjer AST/ALT i kategorija spola koji su izraženi kao apsolutni broj i postotak od ukupnog broja. ‡ Deblje otisnute vrijednosti – vrijednosti koje se statistički značajno razlikuju od kontrole skupine prema Kruskal-Wallis testu uz Conoverov post-hoc test za kontinuirane varijable ili hi-kvadrat testu za kategoričke varijable. Statistička značajnost određena je za $p < 0,05$. ŠB1 – šećerna bolest tipa 1; ITM-SDS – indeks tjelesne mase izražen kao vrijednost standardne devijacije; SKT – sistolički krvni tlak; DKT – dijastolički krvni tlak; UK-K – ukupni kolesterol; LDL-K – kolesterol u lipoproteinima niske gustoće, prema engl. *low-density lipoprotein*; HDL-K – kolesterol u lipoproteinima visoke gustoće, prema engl. *high-density lipoprotein*; TG – trigliceridi; HbA1c – glikirani hemoglobin A1, hemoglobin A1c; HOMA-IR – homeostatski model procjene inzulinske rezistencije, prema engl. *homeostatic model assessment for insulin resistance*; GUK – glukoza u krvi natašte; INS – koncentracija inzulina; AST – aspartat aminotransferaza; ALT – alanin aminotransferaza; ACR – omjer albumina i kreatinina u mokraći, prema engl. *albumin to creatinine ratio*; N/A – nije primjenjivo, prema engl. *not applicable*.

Među našim ispitanicima, čak je 54,8% djece i mladih sa šećernom bolešću imalo povišene koncentracije ukupnog kolesterola, 25,8% je imalo povišen LDL-kolesterol, dok je snižena koncentracija HDL-kolesterola uočena u manje od 10% ispitanika sa šećernom bolešću, a povišene koncentracije triglicerida uočene su u 12,9% te djece (prema kriterijima stručnih društava ISPAD i ADA (Tablica 1) (12-14)). Za razliku od djece sa šećernom bolešću, čak je 54,6% pretila djece u našem istraživanju imalo snižene koncentracija HDL-kolesterola, ukupni kolesterol bio je povišen u 21,2%, a LDL-kolesterol u 18,2% pretila djece, dok ih je 15,2% imalo povišenu koncentraciju triglicerida (Slika 9). Djeca i adolescenti sa šećernom bolešću tipa 1 imali su statistički značajno više koncentracije ukupnog kolesterola u odnosu na skupinu pretila djece i adolescenata te u odnosu na kontrolnu skupinu. Pretila djeca imala su statistički značajno niže vrijednosti HDL-kolesterola u odnosu na druge dvije skupine ispitanika. Koncentracije LDL-kolesterola i triglicerida bile su statistički značajno više u obje skupine bolesnika, u djece sa šećernom bolešću i pretila djece, u usporedbi sa zdravim ispitanicima (Tablica 4).



Slika 9. Udio djece s patološkim vrijednostima lipidograma u skupini djece sa šećernom bolešću tipa 1 i u skupini pretila djece. Prikazani su udjeli ispitanika s povišenim koncentracijama ukupnog kolesterola, LDL-kolesterola i triglicerida te sa sniženom vrijednošću HDL-kolesterola. ŠB1– djeca oboljela od šećerne bolesti tipa 1; UK-K – ukupni kolesterol; LDL-K – kolesterol u lipoproteinima niske gustoće, prema engl. *low-density lipoprotein*; HDL-K – kolesterol u lipoproteinima visoke gustoće, prema engl. *high-density lipoprotein*; TG – trigliceridi.

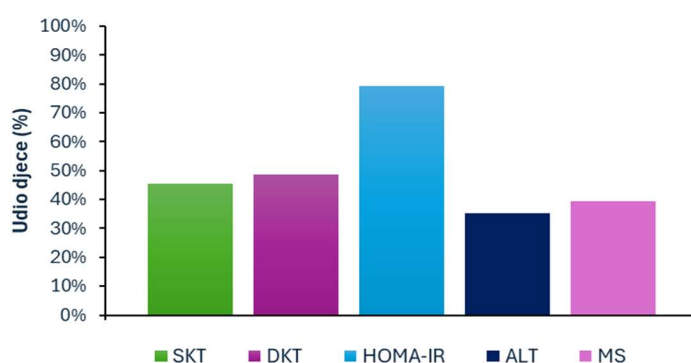
U skupini pretila djece, 45,5% ispitanika imalo je povišen sistolički krvni tlak te 48,5% ispitanika povišen dijastolički krvni tlak (Slika 9), dok je u djece i adolescenata sa šećernom bolešću povišen sistolički krvni tlak izmjeren u 32,2%, a povišen dijastolički krvni tlak u 25,8% ispitanika (prema kriterijima stručnih društava ISPAD i AHA, (14, 56)). Unatoč tome, vrijednosti krvnog tlaka nisu se statistički značajno razlikovale između skupina zdravih i

dijabetičnih ispitanika. U skupini pretila djece, dijastolički krvni tlak bio je statistički značajno viši u odnosu na skupinu zdravih ispitanika.

Skupina pretila djece se statistički značajno razlikovala od zdravih ispitanika i prema stupnju inzulinske rezistencije, izraženo vrijednostima HOMA-IR, s tim da su pretila djeca i adolescenti imali statistički značajno viši stupanj inzulinske rezistencije. U skupini pretila djece čak je 79,4% ispitanika imalo laboratorijske znakove inzulinske rezistencije, pri čemu je ista definirana kao HOMA-IR > 2,6 (94) (Slika 10).

Pretila su djeca imala i statistički značajno više koncentracije jetrenog enzima ALT kao i statistički značajno niži omjer vrijednosti AST/ALT u odnosu na djecu sa šećernom bolešću i zdrave ispitanike. Povišena koncentracija enzima ALT, koja upućuje na steatozu jetre, definirana kao ALT > 40 U/L (93), uočena je u 35,3% pretila djece, dok je omjer vrijednosti AST/ALT < 1 zabilježen u 50 % djece iz te skupine ispitanika (Slika 10).

Omjer albumina i kreatinina u urinu (izražen kao vrijednost ACR) također se statistički značajno razlikovao među skupinama te je bio statistički značajno viši u skupini pretilih ispitanika u odnosu na preostale dvije skupine (Tablica 4).



Slika 10. Udio pretilih ispitanika s pojedinačnim metaboličkim poremećajima i udio onih koji zadovoljavaju kriterije metaboličkog sindroma (MS). Prikazani su udjeli pretilih ispitanika koji imaju povišene vrijednosti sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka (prema kriterijima stručnih društava AHA i ISPAD (14, 56)), HOMA-IR > 2,6 koji upućuje na razvoj inzulinske rezistencije (94) te povišenu koncentraciju enzima ALT (> 40 U/L) koja upućuje na razvoj steatoze jetre (95). Zadnji stupac prikazuje udio pretilih ispitanika koji zadovoljava kriterije za dijagnozu metaboličkog sindroma prema definiciji stručnog društva IDF (96). SKT – sistolički krvni tlak; DKT – dijastolički krvni tlak; HOMA-IR – homeostatski model procjene inzulinske rezistencije, prema engl. *homeostatic model assessment for insulin resistance*; ALT – alanin aminotransferaza; MS – metabolički sindrom; ISPAD – Međunarodno udruženje za pedijatrijsku i adolescentnu dijabetologiju, prema engl. *International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes*; AHA - Američko udruženje za bolesti srca, prema engl. *American Heart Association*; IDF – Međunarodna dijabetička federacija, prema engl. *International Diabetes Federation*.

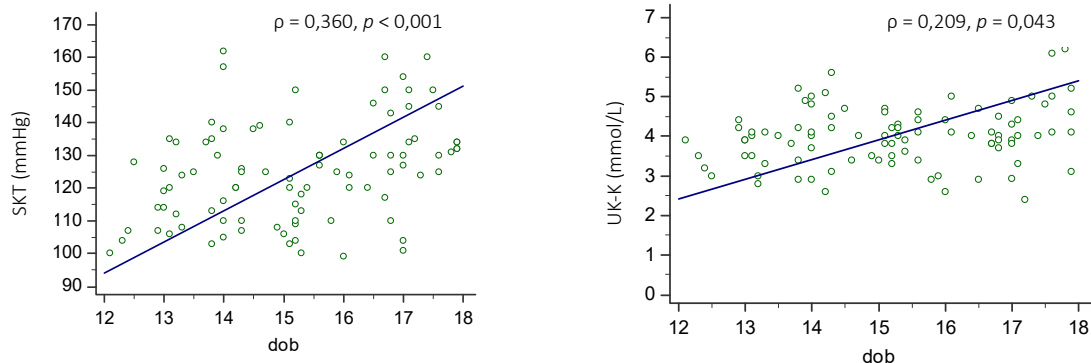
U skupini pretilih, 13 od 34 bolesnika (39,4%) zadovoljavalo je kriterije za dijagnozu metaboličkog sindroma prema definiciji Međunarodne dijabetičke federacije (IDF, prema engl. *International Diabetes Federation*) (96) (Slika 10). Iako se podskupine pretilih bolesnika nisu statistički značajno razlikovala u koncentraciji glukoze u krvi (GUK medijan 4,6 [IQR 4,40 – 4,9] mmol/L u podskupini pretilih bez metaboličkog sindroma vs. GUK medijan 4,9 [IQR 4,62 – 5,55] mmol/L u podskupini pretilih s metaboličkim sindromom, $p = 0,100$), djeca s metaboličkim sindromom imala su statistički značajno viši stupanj inzulinske rezistencije prema vrijednosti HOMA-IR (HOMA-IR medijan 3,76 [IQR 2,41 – 4,89] u podskupini pretilih bez metaboličkog sindroma vs. HOMA-IR medijan 6,04 [IQR 4,37 – 10,00] u podskupini pretilih s metaboličkim sindromom, $p = 0,007$).

U svih ispitanika, od ispitivanih metaboličkih parametara, vrijednosti enzima ALT i triglicerida su bile statistički značajno više u dječaka u odnosu na djevojčice (ALT medijan 19,0 [IQR 14,0 – 29,0] U/L u dječaka vs. ALT medijan 13,5 [IQR 11,0 – 18,0] U/L u djevojčica, $p < 0,001$; trigliceridi medijan 1,05 [0,83 – 1,33] mmol/L u dječaka vs. trigliceridi medijan 1,05 [IQR 0,64 – 1,28] mmol/L u djevojčica, $p = 0,042$) (nije prikazano). Ostali laboratorijski i antropometrijski parametri nisu se statistički značajno razlikovali prema spolu ispitanika.

5.2.1. Povezanost odabranih demografskih, antropometrijskih i kardiometaboličkih parametara

Kako bi dalje karakterizirali uključene skupine ispitanika te pokazali razlike između zdrave i bolesne djece, analizirali smo povezanost odabranih demografskih, antropometrijskih i kardiometaboličkih parametara. Stoga smo pojedine povezanosti najprije prikazivali za sve skupine ispitanika, a zatim istaknuli značajke pojedinih skupina bolesnika. Neke varijable nisu primjenjive za sve skupine pa su analizirane samo u skupinama ispitanika za koje su dostupne (primjerice vrijednosti HOMA-IR i koncentracije glukoze dostupni su za skupine pretila djece i kontrolnih ispitanika, no za djecu sa šećernom bolešću nisu primjenjivi, s druge strane vrijednosti HbA1c dostupne su samo za skupinu djece sa šećernom bolešću).

Uzevši u obzir sve ispitanike uključene u studiju, uočena je statistički značajna pozitivna korelacija dobi s koncentracijom ukupnog kolesterola ($p = 0,209$, $p = 0,043$) i sa sistoličkim krvnim tlakom ($p = 0,360$, $p < 0,001$), dok isto nije utvrđeno za ostale ispitivane metaboličke parametre (Slika 11).



Slika 11. Povezanost sistoličkog krvnog tlaka i koncentracije ukupnog kolesterola s dobi u ukupnom uzorku ispitanika u studiji. Prikazana je korelacija sistoličkog krvnog tlaka i koncentracije ukupnog kolesterola s dobi u svih ispitanika (uključujući sve tri skupine). Povezanost je ispitana koristeći korelaciju ranga te su prikazani Spaermanovi koeficijenti rho (ρ) i p vrijednosti za sve podatke. Statistička značajnost određena je za $p < 0,05$. SKT – sistolički krvni tlak; UK-K – ukupni kolesterol.

Promatrajući zasebno skupinu ispitanika sa šećernom bolešću, uz statistički značajnu pozitivnu korelaciju dobi sa sistoličkim krvnim tlakom ($\rho = 0,443$, $p = 0,013$) uočena je i statistički značajna pozitivna korelacija dobi s vrijednostima ITM-SDS ($\rho = 0,528$, $p = 0,002$) i s vrijednostima biljega CRP ($\rho = 0,368$, $p = 0,045$).

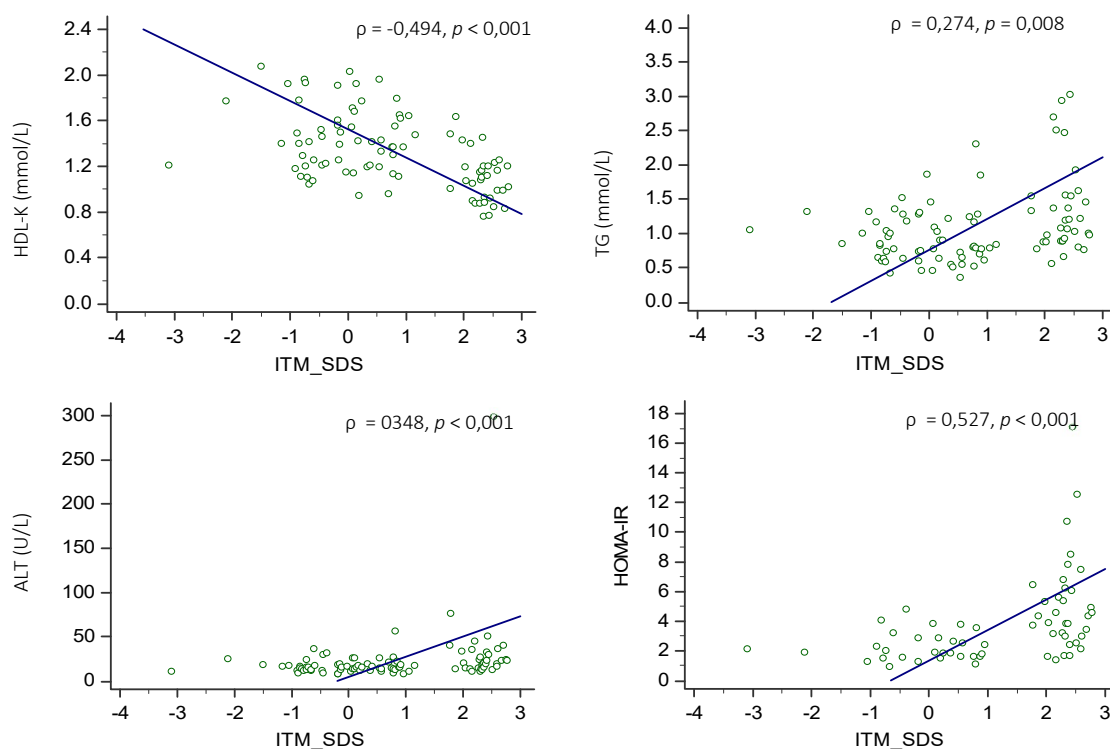
Postotak HbA1c kao ni trajanje šećerne bolesti u toj skupini ispitanika nisu statistički značajno korelirali s analiziranim metaboličkim parametrima.

U pretilih bolesnika dob je također statistički značajno pozitivno korelirala sa sistoličkim krvnim tlakom ($\rho = 0,359$, $p = 0,040$), ali i s koncentracijom triglicerida ($\rho = 0,395$, $p = 0,021$) i enzima ALT ($\rho = 0,435$, $p = 0,010$).

U ukupnom uzorku naših ispitanika utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija vrijednosti ITM-SDS s elementima metaboličkog sindroma: koncentracijom triglicerida ($\rho = 0,274$, $p = 0,008$), koncentracijom enzima ALT ($\rho = 0,348$, $p < 0,001$), s vrijednostima HOMA-IR (samo skupina zdravih i pretilih ispitanika, $\rho = 0,527$, $p < 0,001$) i količinom izlučenog albumina ($\rho = 0,226$, $p = 0,030$) te negativna korelacija s koncentracijom HDL-kolesterola ($\rho = -0,494$, $p < 0,001$) (Slika 12).

Promatrajući zasebno skupinu djece sa šećernom bolešću, vrijednost ITM-SDS je osim s dobi ispitanika statistički značajno pozitivno korelirala i s koncentracijom ukupnog kolesterola ($\rho = 0,471$, $p = 0,008$) i LDL-kolesterola ($\rho = 0,412$, $p = 0,021$), dok je u pretile

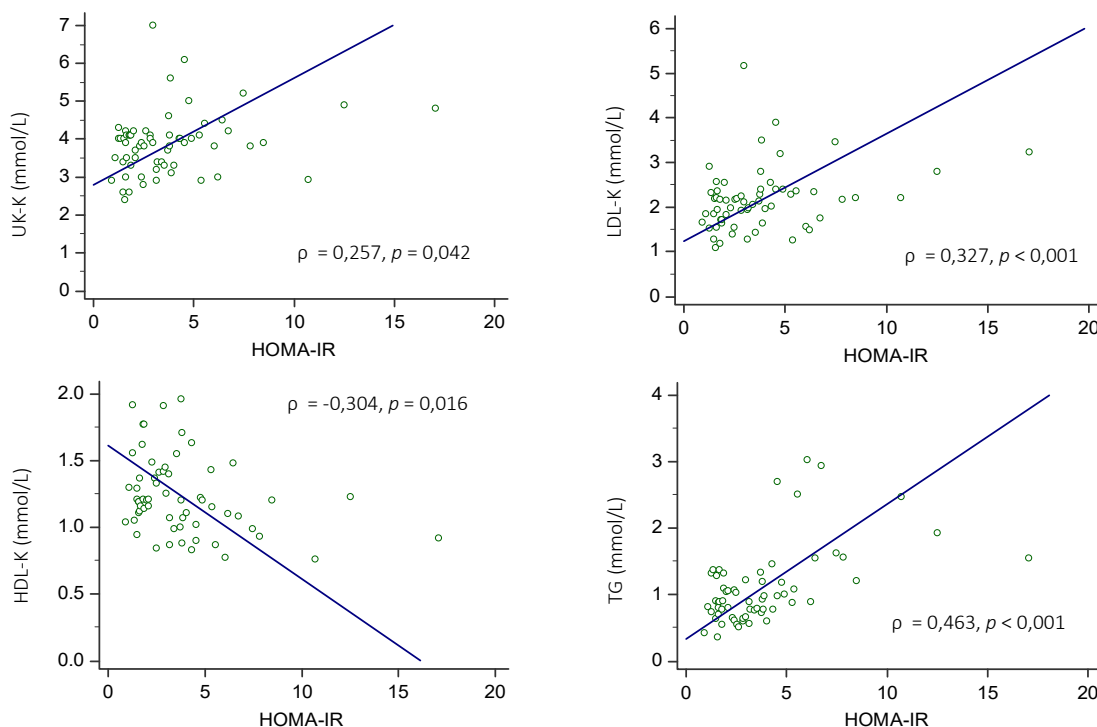
djece za vrijednost ITM-SDS utvrđena statistički značajna pozitivna korelacija sa sistoličkim i ($\rho = 0,538, p = 0,001$) i dijastoličkim krvnim tlakom ($\rho = 0,349, p = 0,047$).



Slika 12. Povezanost indeksa tjelesne mase s elementima metaboličkog sindroma. Prikazana je korelacija vrijednosti ITM-SDS s koncentracijama pojedinih elemenata metaboličkog sindroma (HDL-kolesterola, triglicerida, enzima ALT, vrijednosti HOMA-IR) u ukupnom uzorku ispitanika (sve tri skupine), osim za HOMA-IR koji je analiziran u uzorku koji uključuje skupine zdravih ispitanika i pretila djece. Povezanost je ispitana koristeći korelaciju ranga te su prikazani Spearmanov koeficijent korelacije (ρ) i p vrijednosti za sve podatke. Statistička značajnost određena je za $p < 0,05$. ITM-SDS – indeks tjelesne mase izražen kao vrijednost standardne devijacije; HDL-K – kolesterol u lipoproteinima visoke gustoće, prema engl. *high-density lipoprotein*; TG – trigliceridi; ALT – alanin aminotransferaza; HOMA-IR – homeostatski model procjene inzulinske rezistencije, prema engl. *homeostatic model assessment for insulin resistance*.

Pojedine frakcije lipidograma pokazale su statistički značajnu korelaciju s drugim elementima metaboličkog sindroma, prije svega s vrijednostima HOMA-IR. Uz ranije opisanu statistički značajnu negativnu korelaciju koncentracije HDL-kolesterola i statistički značajnu pozitivnu korelaciju koncentracije triglicerida s vrijednostima ITM-SDS te statistički značajnu pozitivnu korelaciju koncentracije kolesterola s dobi, uočena je statistički značajna pozitivna korelacija koncentracije ukupnog kolesterola ($\rho = 0,257, p = 0,042$), LDL-kolesterola ($\rho =$

0,327, $p < 0,001$) i triglicerida ($\rho = 0,463$, $p < 0,001$) s vrijednostima HOMA-IR te statistički značajna negativna korelacija koncentracije HDL-kolesterola s istim parametrom ($\rho = -0,304$, $p = 0,016$) (Slika 13).



Slika 13. Povezanost indeksa inzulinske rezistencije s promjenama u lipidogramu. U uzorku ispitanika koji uključuje skupine pretile djece i zdravih ispitanika prikazana je korelacija vrijednosti HOMA-IR s koncentracijom pojedinih frakcija lipidograma (koncentracija ukupnog kolesterola, LDL-kolesterola, HDL-kolesterola i triglicerida). Povezanost je ispitana koristeći korelaciju ranga te su prikazani Spearmanov koeficijent (ρ) i p vrijednosti za sve podatke. Statistička značajnost određena je za $p < 0,05$. UK-K – ukupni kolesterol; LDL-kolesterol – kolesterol u lipoproteinima niske gustoće, prema engl. *low-density lipoprotein*; HDL-kolesterol – kolesterol u lipoproteinima visoke gustoće, prema engl. *high-density lipoprotein*; HOMA-IR – homeostatski model procjene inzulinske rezistencije, prema engl. *homeostatic model assessment for insulin resistance*.

U pretile djece uočena je i statistički značajna pozitivna korelacija koncentracije LDL-kolesterola s koncentracijom enzima ALT ($\rho = 0,362$, $p = 0,039$) te statistički značajna pozitivna korelacija koncentracije triglicerida s koncentracijom enzima ALT ($\rho = 0,596$, $p < 0,001$), ali i s vrijednostima HOMA-IR ($\rho = 0,561$, $p < 0,001$).

U djece sa šećernom bolešću koncentracija triglicerida je statistički značajno pozitivno korelirala s udjelom HbA1c ($\rho = 0,543$, $p = 0,002$).

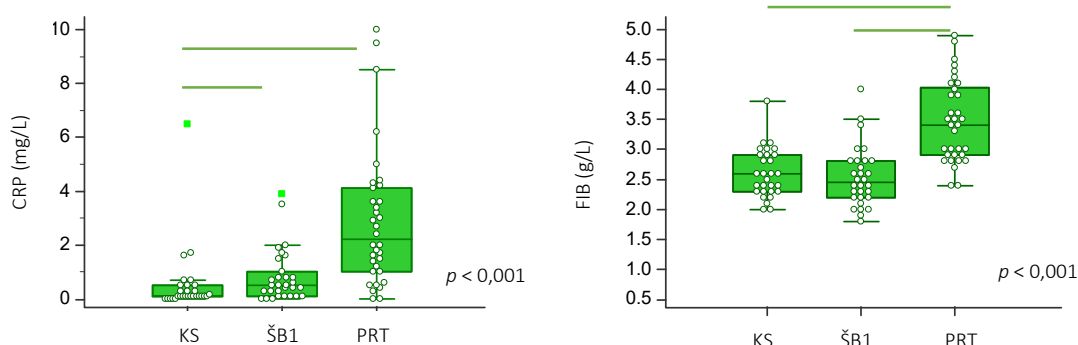
Vrijednosti HOMA-IR (određene samo za kontrolnu skupinu i za skupinu pretila djece), koje su pokazatelj stupnja inzulinske rezistencije, uz vrijednosti ITM-SDS i elemente lipidograma statistički značajno su korelirale i s koncentracijom enzima ALT ($\rho = 0,611$, $p < 0,001$) te s količinom izlučivanja albumina, prikazanom omjerom albumina i kreatinina u prvom jutarnjem urinu (ACR, $\rho = 0,430$, $p < 0,001$).

Albuminurija (omjer albumina i kreatinina u urinu, ACR) je statistički značajno pozitivno korelirala s vrijednostima ITM-SDS i HOMA-IR, dok je uočena statistički značajna negativna korelacija s dobi ispitanika ($\rho = -0,208$, $p = 0,047$).

Ispitivani metabolički parametri nisu pokazali statistički značajnu korelaciju sa stupnjem pubertetskog razvoja prema Tanneru.

5.3. Upalni biljezi u djece sa šećernom bolešću tipa 1, u pretilo djece i u zdravih ispitanika

Nakon metaboličkih parametara, u svrhu procjene upalne aktivnosti u naših smo ispitanika nadalje odredili koncentracije upalnih biljega – CRP i fibrinogena, te smo ispitali njihovu povezanost s kardiometaboličkim faktorima rizika.



Slika 14. Usporedba upalnih biljega među skupinama zdravih ispitanika te djece sa šećernom bolešću tipa 1 i pretilo djece. Prikazane su pojedinačne vrijednosti uz medijane (središnja crta), s okvirima koji predstavljaju interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*) te vanjskim crtama koje predstavljaju 1,5x vrijednost IQR. Usporedbe između skupina učinjene su neparametrijskim Kruskal-Wallis testom te Conoverovim *post-hoc* testom. Statistička značajnost određena je za $p < 0,05$. KS – kontrolna skupina; ŠB1– djeca oboljela od šećerne bolesti tipa 1 trajanja duljeg od 5 godina; PRT – pretili ispitanici; CRP – C-reaktivni protein; FIB – fibrinogen.

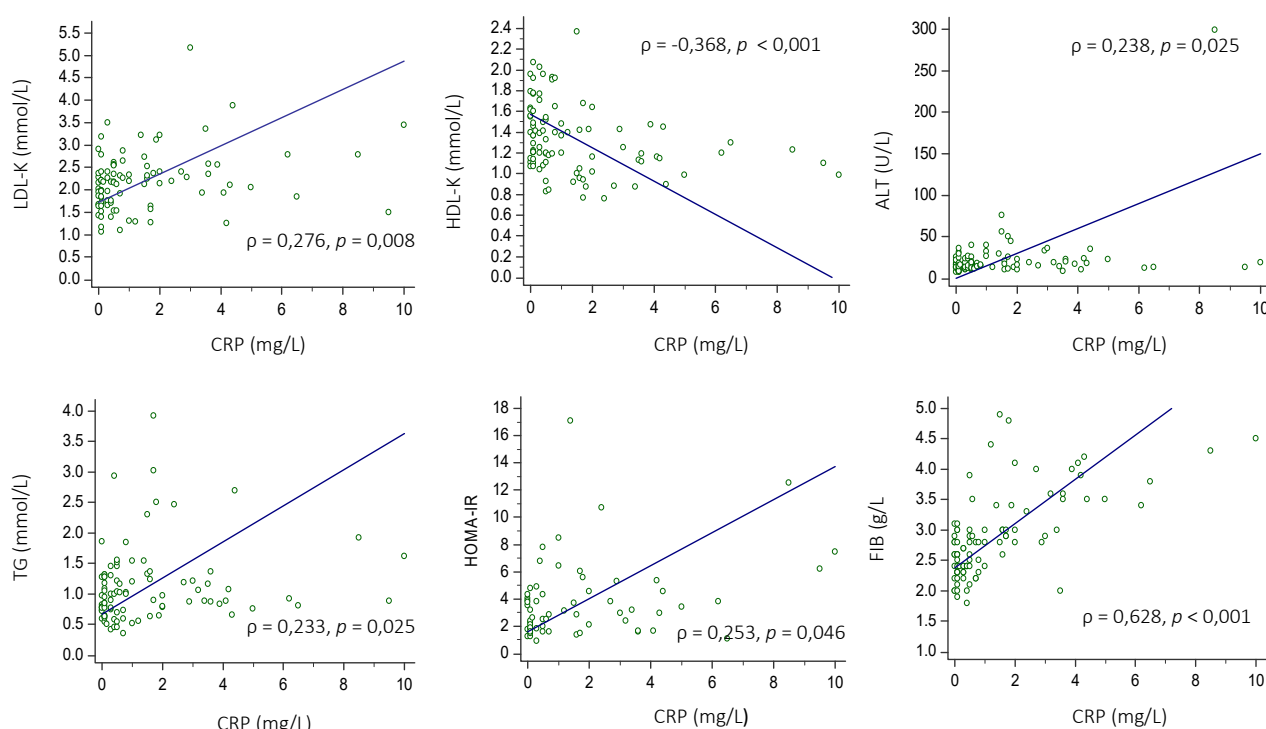
Koncentracija pokazatelja CRP bila je statistički značajno viša u obje ispitivane skupine bolesnika, u djece sa šećernom bolešću tipa 1 (medijan 0.5 [IQR 0.1 – 1.0] mg/L), i u pretilo djece (medijan 2.2 [IQR 1.0 – 4.1] mg/L) u odnosu na zdrave ispitanike (medijan 0.1 [IQR 0,1 – 0,5] mg/L), $p < 0,001$ (Slika 14). Pri tome je čak 32% pretilo djece imalo vrijednosti CRP više od 3 mg/L, za koje se smatra da su povezane s većim kardiometaboličkim rizikom, dok je u djece sa šećernom bolešću isto uočeno u jedne bolesnice. U kontrolnoj skupini niti jedan ispitanik nije imao vrijednosti CRP više od 3 mg/L.

Podskupina pretilo djece koja su zadovoljavala kriterije metaboličkog sindroma nije se statistički značajno razlikovala od ostale pretilo djece prema koncentracijama parametara upale (CRP i fibrinogen).

Pretila djeca imala su i statistički značajno povišenu koncentraciju fibrinogena (medijan 3,4 [IQR 2,9 – 4,1] g/L) u odnosu na zdrave ispitanike (medijan 2,6 [IQR 2,3 – 2,9] g/L), $p <$

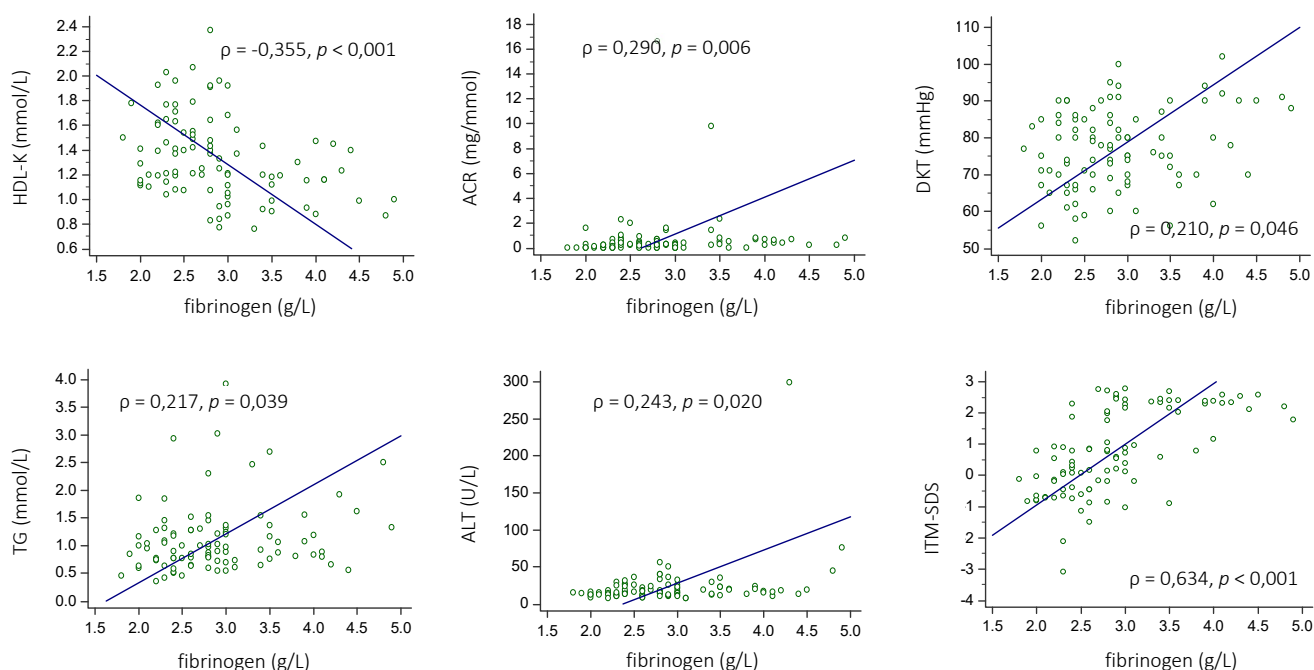
0,001, ali i u odnosu na skupinu djece i adolescenata sa šećernom bolešću (medijan 2,5 [IQR 2,2 – 2,8] g/L), $p < 0,001$. Nije uočena statistički značajna razlika u koncentraciji fibrinogena između skupina djece sa šećernom bolešću i zdravih ispitanika, $p = 0,358$ (Slika 14).

Analizom upalnih parametara u ukupnom uzorku ispitanika (sve tri skupine) uočena je statistički značajna pozitivna korelacija koncentracije biljega CRP s metaboličkim rizičnim čimbenicima: koncentracijom LDL-kolesterola ($\rho = 0,276$, $p = 0,008$), koncentracijom triglicerida ($\rho = 0,233$, $p = 0,025$), koncentracijom enzima ALT ($\rho = 0,238$, $p = 0,025$) i vrijednostima HOMA-IR ($\rho = 0,253$, $p = 0,046$) te statistički značajna negativna korelacija s koncentracijom HDL-kolesterola ($\rho = -0,368$, $p < 0,001$). Snažno, statistički značajno su međusobno pozitivno korelirale koncentracije biljega CRP i fibrinogena ($\rho = 0,628$, $p < 0,001$) (Slika 15).



Slika 15. Povezanost koncentracije upalnog biljega CRP s koncentracijama kardiometaboličkih rizičnih čimbenika. Prikazane su korelacije koncentracije biljega CRP s kardiometaboličkim rizičnim čimbenicima (LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, trigliceridi, ALT i fibrinogen) u ukupnom uzorku ispitanika (sve tri skupine), te s vrijednostima HOMA-IR za skupine zdravih i pretilih ispitanika. Povezanost je ispitana koristeći korelaciju ranga te su prikazani Spearmanov koeficijent (ρ) i p vrijednosti za ukupan uzorak ispitanika (sve tri skupine). Statistička značajnost određena je za $p < 0,05$. CRP – C-reaktini protein; LDL-kolesterol – kolesterol u lipoproteinima niske gustoće, prema engl. *low-density lipoprotein*; HDL-kolesterol – kolesterol u lipoproteinima visoke gustoće, prema engl. *high-density lipoprotein*; ALT – alanin transferaza; TG – trigliceridi; HOMA-IR – homeostatski model procjene inzulinske rezistencije, prema engl. *homeostatic model assessment for insulin resistance*; FIB – fibrinogen.

Za koncentraciju fibrinogena je, uz statistički značajnu pozitivnu korelaciju s vrijednostima ITM-SDS ($\rho = 0,634, p < 0,001$), uočena statistički značajna pozitivna korelacija s elementima metaboličkog sindroma: vrijednošću dijastoličkog krvnog tlaka ($\rho = 0,210, p = 0,046$), koncentracijom triglicerida ($\rho = 0,217, p = 0,038$), koncentracijom enzima ALT ($\rho = 0,243, p = 0,020$) te albuminurijom ($\rho = 0,290, p = 0,006$), a statistički značajna negativna korelacija s koncentracijom HDL-kolesterola ($\rho = -0,355, p < 0,001$) (Slika 16).

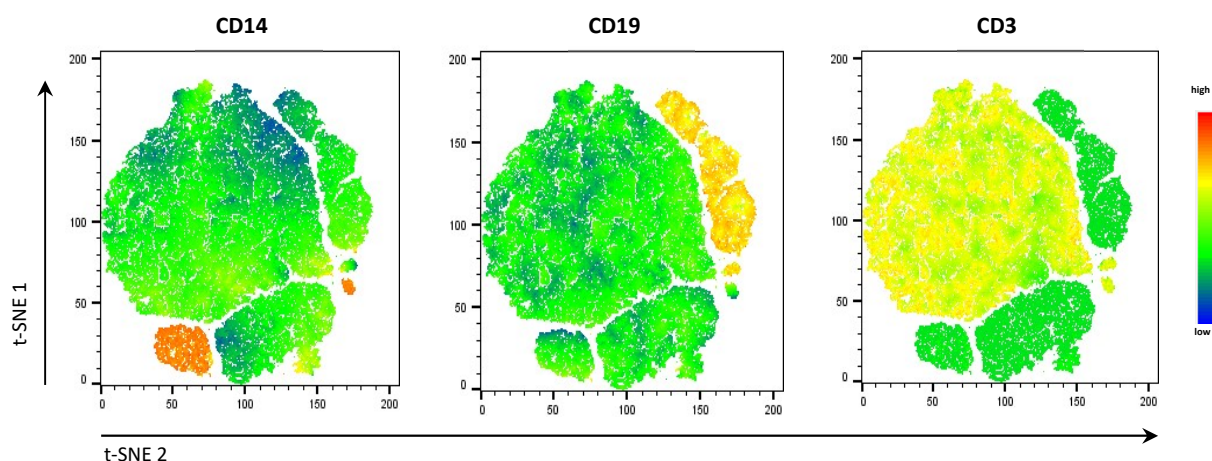


Slika 16. Povezanost koncentracije upalnog biljega fibrinogena s koncentracijama kardiometaboličkih rizičnih čimbenika. Prikazane su korelacije koncentracije fibrinogena s kardiometaboličkim rizičnim čimbenicima (HDL-kolesterol, trigliceridi, ALT, albuminurija, dijastolički krvni tlak i ITM-SDS) u ukupnom uzorku ispitanika (sve tri skupine). Povezanost je ispitana koristeći korelaciju ranga te su prikazani Spearmanov koeficijent (ρ) i p vrijednosti za sve podatke. Statistička značajnost određena je za $p < 0,05$. HDL-kolesterol – kolesterol u lipoproteinima visoke gustoće, prema engl. *high-density lipoprotein*; ALT – alanin aminotransferaza; ACR – omjer albumina i kreatinina u mokraći, prema engl. *albumin to creatinine ratio*; DKT – dijastolički krvni tlak; ITM-SDS – indeks tjelesne mase izražen kao vrijednost standardne devijacije.

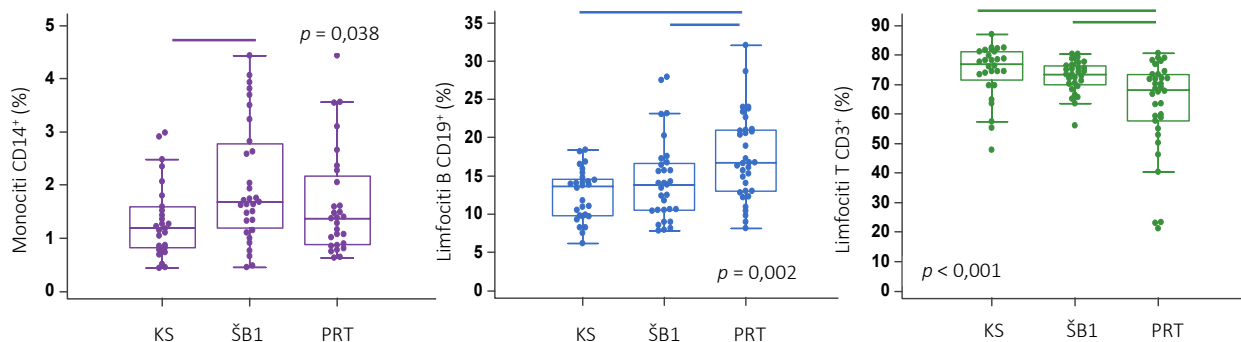
Navedeni rezultati potvrđuju međusobnu povezanost upalnog procesa i metaboličke disfunkcije gdje upala može pridonijeti metaboličkom poremećaju, ali i obrnuto, metabolički poremećaj može pokrenuti upalni proces. Stoga smo se u daljnjim analizama usmjerili na imunosnu komponentu opisanog poremećaja promatrajući razdiobu mononuklearnih stanica periferne krvi te kemokinski sustav.

5.4. Fenotip mononuklearnih stanica periferne krvi u djece sa šećernom bolešću tipa 1, u pretilo djece i u zdravih ispitanika

Ispitivanjem imunofenotipa osnovnih imunosnih populacija mononuklearnih stanica periferne krvi temeljem izražaja specifičnih staničnih biljega (Slike 8 i 17), uočili smo značajne razlike u udjelima pojedinih imunosnih stanica među ispitivanim skupinama. Tako je udio monocita $CD14^+$ bio statistički značajno veći u ispitanika sa šećernom bolešću (1,7 [IQR 1,2 – 2,8]%) u odnosu na kontrolnu skupinu (1,2 [IQR 0,8 – 1,6]%, $p = 0,038$). Nadalje je udio limfocita B $CD19^+$ bio statistički značajno viši u pretilih ispitanika (16,7 [IQR 12,9 – 21,0]%) u odnosu na kontrolnu skupinu (13,6 [IQR 9,8 – 14,6]%, $p = 0,002$), a udio limfocita T $CD3^+$ bio je najveći u zdravih ispitanika (77,0 [IQR 71,5 – 81,2]%) te je u toj skupini ispitanika i u ispitanika sa šećernom bolešću (73,5 [IQR 70,1 – 76,5]%) bio statistički značajno veći u odnosu na pretilo ispitanike (68,2 [IQR 57,8 – 73,4]%, $p < 0,001$) (Slika 18).



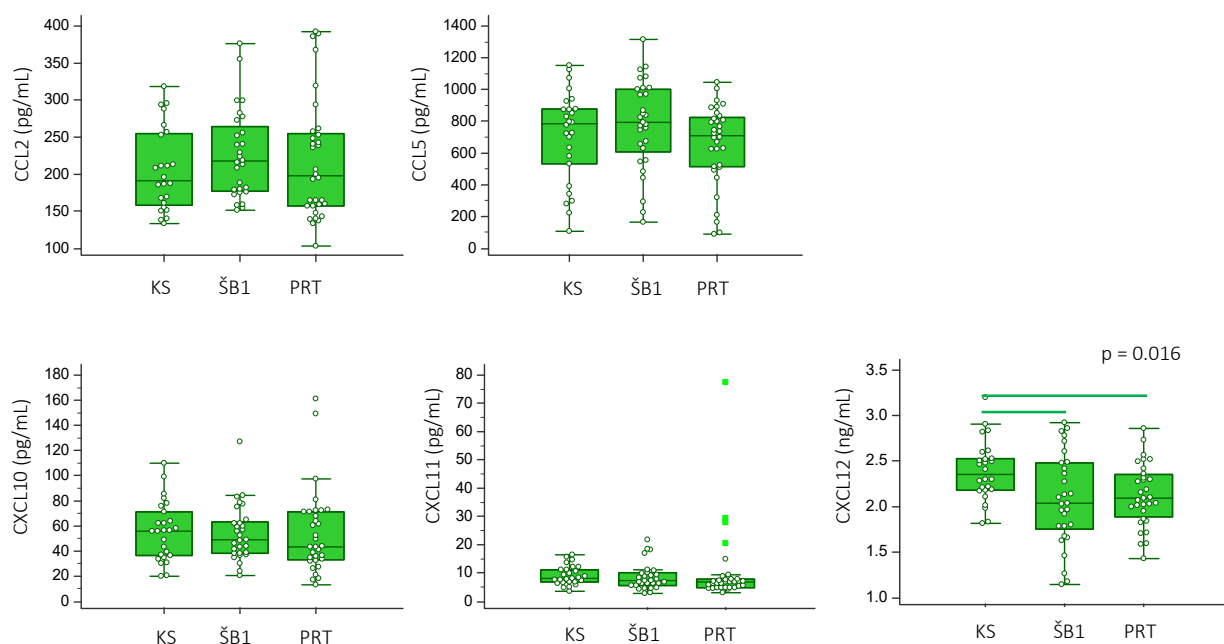
Slika 17. Fenotipizacija osnovnih imunosnih populacija mononuklearnih stanica periferne krvi. Populacije mononuklearnih stanica periferne krvi fenotipizirane su metodom protočne citometrije korištenjem specifičnih staničnih biljega. Prikazana je distribucija populacija monocita ($CD14^+$), limfocita B ($CD19^+$) i limfocita T ($CD3^+$) među mononuklearima periferne krvi. Vizualna prezentacija distribucije staničnih populacija napravljena je pomoću algoritma t-SNE (prema engl. *T-distributed stochastic neighbor embedding*) korištenjem kompenziranih fluorescentnih kanala za svaki biljeg nakon propuštanja barem 200.000 događaja. Prikazani su reprezentativni grafikoni intenziteta fluorescencije u obliku toplinskih mapa (niži intenzitet plava boja, viši intenzitet crvena boja). CD – stanični biljeg, prema engl. *cluster of differentiation*.



Slika 18. Udio imunskih populacija mononuklearnih stanica periferne krvi u skupini kontrolnih ispitanika u odnosu na bolesnike sa šećernom bolešću i s pretilošću. Populacije mononuklearnih stanica periferne krvi fenotipizirane su metodom protočne citometrije korištenjem specifičnih staničnih biljega. Prikazana je usporedba udjela pojedinih mononuklearnih stanica periferne krvi (monociti CD14⁺, limfociti B CD19⁺, limfociti T CD3⁺) među skupinama ispitanika: kontrolna skupina (KS), djeca i adolescenti sa šećernom bolešću tipa 1 (ŠB1) te pretili ispitanici (PRT). Prikazane su pojedinačne vrijednosti uz medijane (središnja crta), s okvirima koji predstavljaju interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*) te vanjskim crtama koje predstavljaju 1,5x vrijednost IQR. Usporedbe između skupina učinjene su neparametrijskim Kruskal-Wallis testom te Conoverovim *post-hoc* testom. Statistička značajnost određena je za $p < 0,05$. CD – stanični biljeg, prema engl. *cluster of differentiation*.

5.5. Koncentracija kemokina u djece i adolescenata sa šećernom bolešću tipa 1, u pretiloj djece i u zdravih ispitanika

S obzirom da su kemokinski signali ključni za privlačenje imunskih stanica u ciljna tkiva odredili smo koncentracije odabranih kemokina u plazmi, a u nastavku i izražaj kemokinskih receptora na imunskim populacijama periferne krvi. Ispitivanjem koncentracije odabranih CC-kemokina (CCL2, CCL5) i CXC-kemokina (CXCL10, CXCL11, CXCL12) u naših ispitanika uočili smo statistički značajno nižu koncentraciju kemokina CXCL12 u djece sa šećernom bolešću (2,0 [IQR 1,8 – 2,5] ng/mL) i u pretiloj djece (2,1 [IQR 1,9 – 2,4] ng/mL) u odnosu na skupinu zdravih ispitanika (2,4 [IQR 2,2 – 2,5] ng/mL, $p = 0,016$) (Slika 19).



Slika 19. Plazmatske koncentracije kemokina u skupini kontrolnih ispitanika u odnosu na bolesnike sa šećernom bolešću i pretilošću. Koncentracije kemokina određene su metodom protočne citometrije korištenjem mikrokuglica obloženih specifičnim protutijelima (CCL2, CCL5, CXCL10, CXCL11) te metodom ELISA (CXCL12). Prikazana je usporedba koncentracija pojedinih kemokina među skupinama ispitanika: kontrolna skupina (KS), djeca i adolescenti sa šećernom bolešću tipa 1 (ŠB1) te pretili ispitanici (PRT). Prikazane su pojedinačne vrijednosti uz medijane (središnja crta), s okvirima koji predstavljaju interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*) te vanjskim crtama koje predstavljaju 1,5x vrijednost IQR. Usporedbe između skupina učinjene su neparametrijskim Kruskal-Wallis testom te Conoverovim *post-hoc* testom. Statistička značajnost određena je za $p < 0,05$. CCL – kemokinski ligand s C-C motivom; CXCL – kemokinski ligand s C-X-C motivom.

S obzirom da nismo našli statistički značajnu razliku u koncentracijama za većinu odabranih kemokina, u skupinama bolesnika definirali smo podskupine u kojih se očekuju izraženiji metabolički poremećaji: podskupina djece s loše reguliranom šećernom bolešću definirano kao $HbA1c > 8\%$ te podskupina djece s težim stupnjem pretilosti definirano kao $ITM-SDS > 2.0$.

U podskupini bolesnika s nezadovoljavajućom regulacijom šećerne bolesti ($HbA1c > 8\%$) uočena je značajno viša koncentracija kemokina CCL2 (241,0 [IQR 189,6 – 295,3] pg/mL) u odnosu na kontrolnu skupinu (191,5 [IQR 158,0 – 254,7] pg/mL, $p = 0,033$). U podskupini s težim stupnjem pretilosti uočena je značajno niža koncentracija CXCL11 (6,6 [IQR 4,9 – 7,7] pg/mL) u odnosu na skupinu zdravih ispitanika (8,2 [IQR 6,9 – 11,3] pg/mL, $p = 0,018$).

5.6. Izražaj kemokinskih receptora na imunosnim populacijama mononuklearnih stanica periferne krvi

Analizom kemokina u naših bolesnika zaključili smo da pojedini kemokini mogu imati ulogu u patogenezi razvoja šećerne bolesti tipa 1 i pretilosti te smo nadalje odlučili analizirati profil odgovarajućih kemokinskih receptora na podskupinama mononuklearnih imunosnih stanica periferne krvi u skupinama bolesnika, u djece sa šećernom bolešću tipa 1 i u pretilu djece.

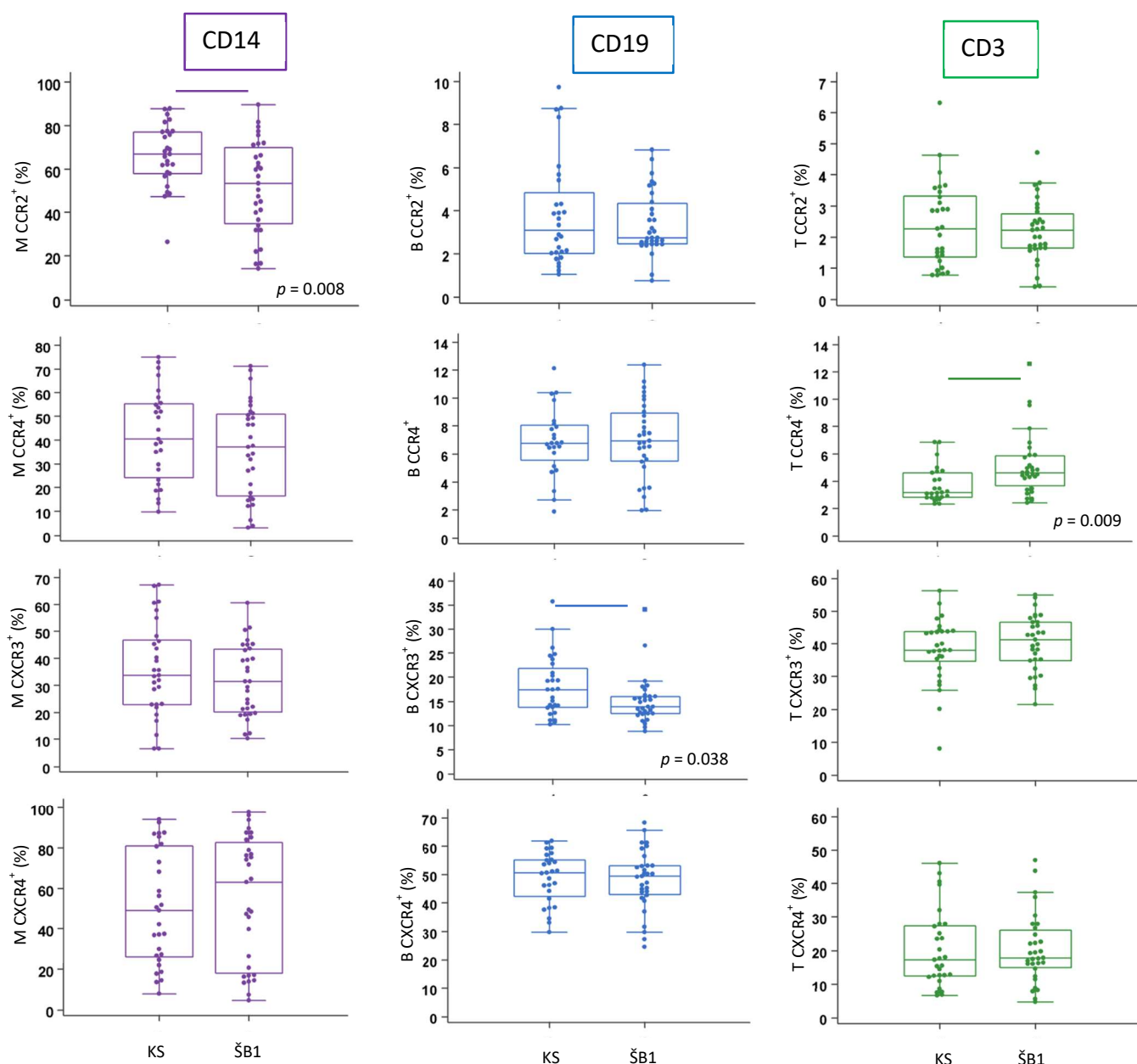
Analizirali smo izražaj receptora CCR2 i CCR4 koji vezuju kemokine CCL2 i CCL5, receptor CXCR3 za kemokine CXCL10 i CXCL11 te receptor CXCR4 za CXCL12.

Analizom odabranih kemokinskih receptora uočeno je da su monociti CD14⁺ izražavali i CC – i CXC – kemokinske receptore, dok su limfociti B CD19⁺ i limfociti T CD3⁺ dominantno izražavali CXC – receptore (Slika 8).

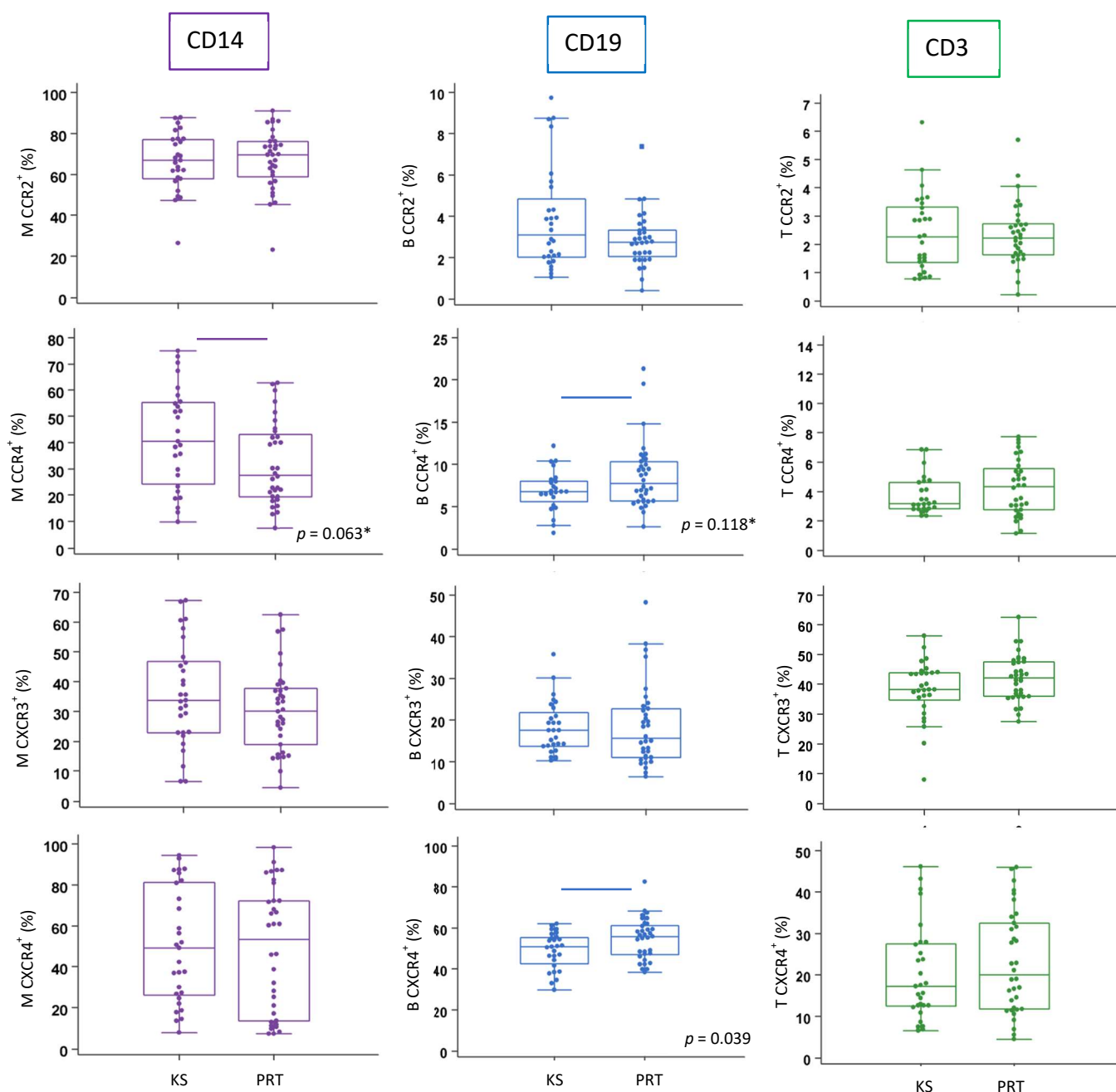
U sljedećem smo koraku analizirali profil kemokinskih receptora specifičan za svaku bolest.

5.6.1. Izražaj kemokinskih receptora u djece sa šećernom bolešću tipa 1

U skupni djece sa šećernom bolešću uočena su odstupanja u udjelima ispitivanih imunosnih populacija mononuklearnih stanica periferne krvi koje izražavaju pojedine kemokinske receptore u odnosu na kontrolne ispitanike. Tako je udio monocita CD14⁺ koji izražavaju receptor CCR2 bio statistički značajno manji u ispitanika sa šećernom bolešću (53,4 [IQR 34,6 – 69,9]%) u odnosu na zdrave ispitanike (66,7 [IQR 57,8 – 77,1]%, $p = 0,008$). To je praćeno i statistički značajno višim koncentracijama kemokina CCL2 u djece sa šećernom bolešću koja imaju lošu kontrolu glikemije ($HbA1c > 8\%$). U djece sa šećernom bolešću, i u subpopulaciji limfocita B CD19⁺ uočene su razlike u izražaju receptora pa je udio limfocita B koji izražavaju kemokinski receptor CXCR3 bio statistički značajno manji (13,8 [IQR 12,4 – 16,0]%) u odnosu na zdrave ispitanike (17,5 [IQR 13,7 – 21,8]%, $p = 0,038$). S druge strane, u djece sa šećernom bolešću statistički je značajno veći udio limfocita T CD3⁺ koji izražavaju receptor CCR4 (4,6 [IQR 3,6 – 5,9]%) u odnosu na zdrave ispitanike (3,2 [IQR 2,8 – 4,6]%, $p = 0,009$) (Slika 20).



Slika 20. Razlike u izražaju odabranih kemokinskih receptora između djece sa šećernom bolešću tipa 1 i kontrolne skupine ispitanika. Mononuklearne stanice periferne krvi koje izražavaju kemokinske receptore fenotipizirane su metodom protočne citometrije. Prikazane su usporedbe udjela monocita (CD14⁺), limfocita B (CD19⁺) i limfocita T (CD3⁺) koji izražavaju receptore CCR2, CCR4, CXCR3 i CXCR4 između skupina djece sa šećernom bolešću tipa 1 (ŠB1) i (KS) Prikazane su pojedinačne vrijednosti uz medijane (središnja crta), s okvirima koji predstavljaju interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*) te vanjskim crtama koje predstavljaju 1,5x vrijednost IQR. Usporedbe između skupina učinjene su neparametrijskim Kruskal-Wallis testom te Conoverovim *post-hoc* testom. Statistička značajnost određena je za $p < 0,05$. CD – stanični biljeg, prema engl. *cluster of differentiation*; CCR – receptor za kemokinski ligand s C-C motivom; CXCR – receptor za kemokinski ligand s C-X-C motivom.



Slika 21. Razlike u izražaju odabranih kemokinskih receptora između pretile djece i kontrolne skupine ispitanika. Mononuklearne stanice periferne krvi koje izražavaju kemokinske receptore fenotipizirane su metodom protočne citometrije. Prikazane su usporedbe udjela monocita (CD14⁺), Limfocita B (CD19⁺) i limfocita T (CD3⁺) koji izražavaju receptore CCR2, CCR4, CXCR3 i CXCR4 između skupina pretile djece (PRT) i kontrolne skupine (KS). Prikazane su pojedinačne vrijednosti uz medijane (središnja crta), s okvirima koji predstavljaju interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*) te vanjskim crtama koje predstavljaju 1,5x vrijednost IQR. Usporedbe između skupina učinjene su neparametrijskim Kruskal-Wallis testom te Conoverovim *post-hoc* testom. Statistička značajnost određena je za $p < 0,05$; CD – stanični biljeg, prema engl. *cluster of differentiation*; KS – kontrolna skupina; PRT – pretili ispitanici; CCR – receptor za kemokinski ligand s C-C motivom; CXCR – receptor za kemokinski ligand s C-X-C motivom.

5.6.2. Izražaj kemokinskih receptora u pretilo djece

U pretilo djece također smo uočili neka odstupanja u udjelu subpopulacija monocita CD14⁺ i limfocita B CD19⁺ koje izražavaju pojedine kemokinske receptore, dok se izražaj kemokinskih receptora na limfocitima T nije značajno razlikovao od zdravih ispitanika. Tako je udio monocita CD14⁺ koji izražavaju receptor CCR4 bio granično manji u pretilih ispitanika (27,6 [IQR 19,3 – 43,2]%) u odnosu na zdrave ispitanike (40,4 [IQR 24,3 – 55,4]%, $p = 0.063$). S druge strane, udio limfocita B CD19⁺ koji izražavaju receptore CCR4 bio je granično veći (7,7 [IQR 5,6 – 10,3]%) u odnosu na zdrave ispitanike (6,8 [IQR 5,6 – 8,0]%, $p = 0.118$), a receptor CXCR4 bio je statistički značajno veći u pretilo djece (55,8 [IQR 47,0 – 61,1]%) u odnosu na zdrave ispitanike (50,7 [IQR 42,3 – 55,3]%, $p = 0.039$) (Slika 21). Uz to je plazmatska koncentracija kemokina CXCL12 (koji se veže na receptor CXCR4) bila statistički značajno manja u pretilo djece u odnosu na kontrolne ispitanike (Slike 19 i 21).

5.7. Korelacije kemokina i izražavanja ispitivanih kemokinskih receptora na populacijama mononuklearnih stanica s upalnim i metaboličkim parametrima specifične za bolest

Krajnji cilj istraživanja bio je utvrditi povezanost kardiometaboličkih čimbenika rizika i pokazatelja upalnog stanja, stoga smo u zadnjem dijelu istraživanja analizirali korelacije izražaja kemokinskih receptora i koncentracija kemokina s kardiometaboličkim parametrima i stupnjem bolesti. I šećerna bolest i pretilost u konačnici mogu voditi sličnim vaskularnim komplikacijama, te smo u analizi povezanosti posebnu pažnju obratili na značajne korelacije koje su specifične za pojedinu bolest, ali i na značajne korelacije koje su se preklapale u oboljelih od šećerne bolesti i u pretilih. Zajedničke promjene upalnih parametara mogu predstavljati moguće rane biljege korisne u praćenju razvoja vaskularnih komplikacija bolesti te u budućnosti predstavljati zajedničke terapijske ciljeve.

5.7.1. Povezanost profila kemokina i kemokinskih receptora s kardiometaboličkim čimbenicima rizika u šećernoj bolesti

Od svih uočenih statistički značajnih povezanosti, za profil kemokina možemo izdvojiti statistički značajnu pozitivnu korelaciju koncentracije kemokina CCL2 i postotka HbA1c te statistički značajnu pozitivnu korelaciju kemokina CXCL12 i albuminurije. Potonja je praćena istovremeno snažnim statistički značajno negativnim korelacijama izražaja odgovarajućeg receptora CXCR4 na svim promatranim populacijama mononukleara periferne krvi. Uz navedeno, analizom profila kemokinskih receptora, ističu se statistički značajno pozitivne korelacije s trajanjem šećerne bolesti (prije svega za sve populacije mononukleara koje izražavaju receptor CCR4) i s krvnim tlakom te izražene, statistički značajno negativne korelacije izražaja više kemokinskih receptora s upalnim biljezima CRP i fibrinogen te već spomenutom albuminurijom (Slika 22).

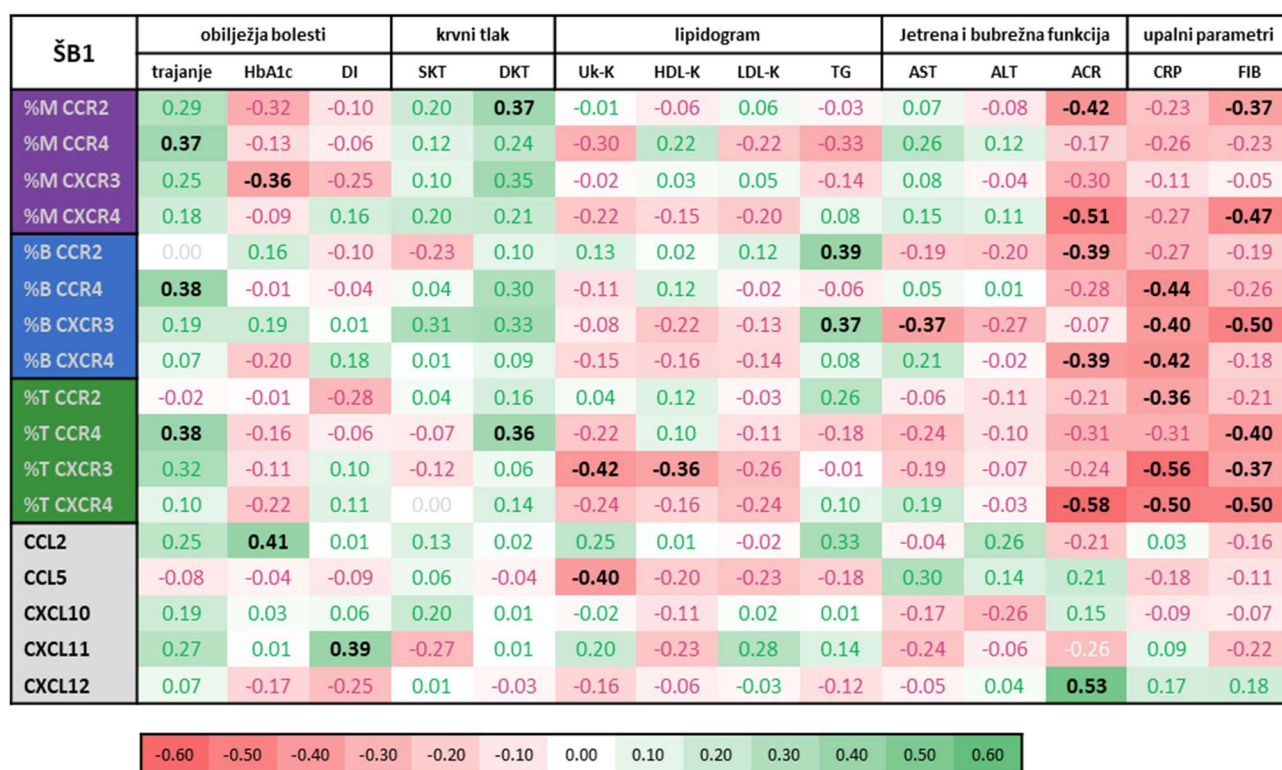
Detaljno gledano, u skupini ispitanika sa šećernom bolešću koncentracija kemokina CCL2 je statistički značajno pozitivno korelirala s udjelom HbA1c, dok je koncentracija kemokina CXCL11 statistički značajno pozitivno korelirala s dozom inzulina, a koncentracija kemokina CXCL12 s omjerom albumina i kreatinina u urinu. Koncentracija kemokina CCL5 je statistički značajno negativno korelirala s koncentracijom ukupnog kolesterola (Slika 22).

Analizom udjela pojedinih populacija imunosnih stanica u djece sa šećernom bolešću uočena je statistički značajna pozitivna korelacija udjela monocita CD14⁺, koja je u toj skupini bila najviša, s dozom inzulina ($\rho = 0,394$, $p = 0,028$) i s vrijednošću ITM-SDS ($\rho = 0,366$, $p = 0,046$) te statistički značajna negativna korelacija s koncentracijom enzima AST ($\rho = -0,431$, $p = 0,015$) (nije slikovno prikazano).

Udio monocita CD14⁺ koji izražavaju receptor CCR2 statistički je značajno pozitivno korelirao s vrijednošću dijastoličkog krvnog tlaka, dok je uočena statistički značajna negativna korelacija s omjerom albumina i kreatinina u urinu te s koncentracijom fibrinogena. Uočena je statistički značajna pozitivna korelacija udjela monocita CD14⁺ koji izražavaju receptor CCR4 s trajanjem šećerne bolesti. Udio monocita CD14⁺ koji izražavaju receptor CXCR3 statistički je značajno negativno korelirao s udjelom HbA1c, dok je udio monocita CD14⁺ koji izražavaju receptor CXCR4 statistički značajno negativno korelirao s omjerom albumina i kreatinina te s koncentracijom fibrinogena (Slika 22).

Udio limfocita B CD19⁺ koji izražavaju receptor CCR2 statistički je značajno pozitivno korelirao s koncentracijom triglicerida te negativno s omjerom albumina i kreatinina, dok je i

udio limfocita B CD19⁺ koji izražavaju receptor CCR4 statistički značajno pozitivno korelirao s trajanjem šećerne bolesti. Udio limfocita B CD19⁺ koji izražavaju receptor CXCR3 statistički je značajno pozitivno korelirao s koncentracijom triglicerida, dok je statistički značajna povezanost s koncentracijom enzima AST bila negativnog predznaka. Udio limfocita B CD19⁺ koji izražavaju CXCR4 statistički je značajno negativno korelirao s omjerom albumina i kreatinina. Izražaj više receptora na populaciji limfocita B CD19⁺ statistički je značajno negativno korelirao s upalnim biljezima, prije svega biljegom CRP (Slika 22).



Slika 22. Povezanost profila kemokinskih receptora i koncentracije kemokina s kardiometaboličkim parametrima u bolesnika sa šećernom bolešću tipa 1. Prikazani su smjer i jačina korelacije koncentracije pojedinog kemokina (CCL2, CCL5, CXCL10, CXCL11, CXCL12) odnosno izražaja kemokinskih receptora (CCR2, CCR4, CXCR3, CXCR4) na populacijama mononuklearnih stanica periferne krvi (monocita CD14⁺, limfocita B CD19⁺ i limfocita T CD3⁺) s kardiometaboličkim rizičnim čimbenicima koji uključuju obilježja bolesti, krvni tlak, lipidogram, jetrenu i bubrežnu funkciju te s parametrima upale. Stanice periferne krvi koje izražavaju kemokinske receptore određene su metodom protočne citometrije, a koncentracije kemokina određene su metodom protočne citometrije pomoću mikrokuglica (CCL2, CCL5, CXCL10, CXCL11) ili ELISA (CXCL12). Povezanost je ispitana koristeći korelaciju ranga te su prikazani Spearmanovi koeficijenti korelacije (ρ) koji su kodirani bojom te crveni spektar predstavlja negativne korelacije, a zeleni spektar pozitivne korelacije. Statistička značajnost određena je za $p < 0,05$ (u tablici deblje otisnuto) Na dnu slike nalazi se shema obojanih kodova raspona vrijednosti ρ . ŠB1 – djeca oboljela od šećerne bolesti tipa 1; HbA1c – glikirani hemoglobin A1, hemoglobin A1c; DI – doza inzulina; SKT – sistolički krvni tlak; DKT – dijastolički krvni tlak; Uk-K – ukupni kolesterol; LDL-K – kolesterol u lipoproteinima niske gustoće, prema engl. *low-density lipoprotein*; HDL-K – kolesterol u lipoproteinima visoke gustoće, prema engl. *high-density lipoprotein*; TG – trigliceridi; AST – aspartat aminotransferaza; ALT – alanin aminotransferaza; ACR – omjer albumina i kreatinina u mokraći, prema engl. *albumin to creatinine ratio*; CRP – C-reaktivni protein; FIB – fibrinogen.

U ispitanika sa šećernom bolešću populacija limfocita T CD3⁺ statistički je značajno pozitivno korelirala s udjelom HbA1c. Udio limfocita T CD3⁺ koji izražavaju receptor CCR4 statistički je značajno pozitivno korelirao s vrijednostima dijastoličkog krvnog tlaka te s trajanjem šećerne bolesti dok je uočena statistički značajna negativna korelacija s koncentracijom fibrinogena. Nadalje, udio limfocita T CD3⁺ koji izražava receptor CXCR3 statistički je značajno negativno korelirao s koncentracijom ukupnog kolesterola i HDL-kolesterola, a udio koji izražava receptor CXCR4 statistički je značajno negativno korelirao i s omjerom albumina i kreatinina. Obje spomenute populacije limfocita T CD3⁺ statistički su značajno negativno korelirale s koncentracijama upalnih biljega CRP i fibrinogena (Slika 22).

5.7.2. Povezanost profila kemokina i kemokinskih receptora s kardiometaboličkim čimbenicima rizika u pretilosti

Slično kao i za šećernu bolest najprije ističemo glavne nalaze povezanosti. Ukupno gledajući, analizom profila kemokina u skupini pretila djece uočava se više pozitivnih korelacija s upalnim biljezima i metaboličkim parametrima. Posebice se ističu statistički značajne pozitivne korelacije koncentracije kemokina CXCL12 s plazmatskom koncentracijom glukoze natašte, koncentracijom triglicerida te koncentracijom jetrenih enzima. Profil kemokinskih receptora obilježava statistički značajna negativna povezanost gotovo svih subpopulacija monocita CD14⁺ te svih mononukleara koji izražavaju receptor CXCR4 s vrijednostima omjera albumina i kreatinina u urinu, što je slično nalazu u djece sa šećernom bolešću, no izostaju statistički značajne korelacije s upalnim parametrima. Izuzetak je statistički značajna negativna korelacija udjela limfocita B CD19⁺ koji izražava receptor CXCR4 s koncentracijom upalnog biljega CRP (Slika 23).

Detaljno gledajući, u pretilih ispitanika uočena je statistički značajna pozitivna korelacija koncentracije kemokina CCL2 s koncentracijom enzima ALT. Koncentracije kemokina CCL5 i CXCL11 statistički su značajno pozitivno korelirale s upalnim parametrom CRP, dok je koncentracija kemokina CXCL11 pozitivno korelirala i s koncentracijom fibrinogena, no ta povezanost nije bila statistički značajna. Kako je već istaknuto, koncentracije kemokina CXCL12 statistički su značajno pozitivno korelirale s koncentracijama glukoze u krvi, koncentracijom triglicerida te jetrenih enzima AST i ALT (Slika 23).

Analizom udjela pojedinih populacija imunosnih stanica, u pretila djece je uočeno da udio monocita CD14⁺ koji izražavaju receptor CCR2 statistički značajno pozitivno korelira s

vrijednostima ITM-SDS, dok su udjeli monocita $CD14^+$ koji izražavaju receptore CCR4, CXCR3 i CXCR4 statistički značajno negativno korelirali s omjerom albumina i kreatinina u urinu, s time da je udio monocita $CD14^+$ koji izražavaju receptor CXCR4 statistički značajno negativno korelirao i s vrijednošću HOMA-IR (Slika 23).

Udio populacije limfocita B $CD19^+$ bio je viši u skupini pretilih djece u odnosu na kontrolne ispitanike, uz statistički značajnu pozitivnu povezanost sa serumskom koncentracijom glukoze natašte ($p = 0,485$, $p = 0,004$). Nadalje, u pretilih je ispitanika udio limfocita B $CD19^+$ statistički značajno pozitivno korelirao s koncentracijom fibrinogena. Udio populacije limfocita B $CD19^+$ koja izražavaju receptor CXCR4 statistički je značajno negativno korelirao s omjerom albumina i kreatinina u urinu i s koncentracijom upalnog biljega CRP (Slika 23).

Statistički značajna negativna povezanost s omjerom albumina i kreatinina u urinu dokazana je i za udio limfocita T $CD3^+$ koji izražavaju receptor CXCR4. Osim navedenog, udio limfocita T $CD3^+$ koji izražavaju receptor CCR4 statistički je značajno negativno korelirao s koncentracijom glukoze u krvi, a pozitivno s vrijednošću sistoličkog krvnog tlaka, dok je udio tih stanica koje izražavaju receptor CXCR3 statistički značajno negativno korelirao s koncentracijom HDL-kolesterola (Slika 23).

PRT	obilježja bolesti			krvni tlak		lipidogram				jetrena i bubrežna funkcija			upalni parametri	
	ITM-SDS	GUK	HOMA-IR	SKT	DKT	Uk-K	HDL-K	LDL-K	TG	AST	ALT	ACR	CRP	FIB
%M CCR2	0.37	0.11	0.06	0.32	0.13	-0.15	-0.27	-0.02	0.09	0.05	-0.01	-0.34	0.06	-0.11
%M CCR4	0.32	0.02	-0.12	0.20	0.14	0.05	-0.07	0.12	-0.10	-0.06	-0.08	-0.53	0.11	0.04
%M CXCR3	0.05	0.10	-0.04	-0.02	-0.22	-0.05	-0.25	0.00	0.06	-0.06	-0.02	-0.51	-0.23	-0.14
%M CXCR4	0.08	-0.15	-0.36	0.06	-0.13	0.04	0.08	0.22	-0.15	-0.28	-0.32	-0.48	0.07	0.08
%B CCR2	-0.11	-0.04	-0.15	0.09	0.05	0.14	0.25	0.12	-0.04	-0.03	-0.07	-0.20	-0.06	-0.14
%B CCR4	0.14	-0.16	-0.01	0.21	0.23	0.01	-0.18	0.18	0.24	-0.04	-0.13	-0.15	0.10	0.18
%B CXCR3	0.17	-0.26	-0.25	0.18	0.24	-0.02	-0.02	0.16	0.03	-0.11	-0.22	0.10	0.10	0.16
%B CXCR4	-0.06	-0.05	0.11	-0.18	-0.10	-0.31	-0.14	-0.13	-0.09	-0.01	-0.13	-0.44	-0.45	-0.27
%T CCR2	-0.29	0.06	-0.02	-0.08	0.03	0.03	0.29	-0.15	-0.08	0.13	-0.03	0.06	0.08	-0.33
%T CCR4	0.19	-0.35	-0.23	0.38	0.33	-0.14	-0.17	-0.03	0.11	-0.09	-0.29	-0.29	0.00	0.17
%T CXCR3	-0.01	0.18	-0.27	-0.01	-0.17	-0.20	-0.37	-0.01	0.04	0.05	0.05	-0.26	-0.01	-0.02
%T CXCR4	-0.03	-0.08	-0.20	-0.11	-0.22	0.05	0.06	0.24	-0.12	-0.20	-0.23	-0.51	-0.18	-0.23
CCL2	-0.02	0.26	0.26	0.03	0.13	0.22	-0.09	0.03	0.33	0.32	0.49	0.11	-0.02	-0.10
CCL5	-0.07	0.19	0.06	-0.23	-0.24	0.16	0.19	0.15	0.02	0.11	0.06	-0.16	0.41	0.10
CXCL10	0.00	0.12	-0.12	0.02	0.14	-0.20	-0.10	-0.20	-0.15	0.11	0.02	0.14	-0.15	-0.06
CXCL11	-0.14	0.20	-0.10	-0.12	0.15	0.09	0.35	-0.01	-0.10	0.15	0.20	0.01	0.37	0.33
CXCL12	-0.18	0.57	0.12	0.04	-0.06	0.27	-0.24	0.13	0.39	0.42	0.46	-0.13	-0.01	-0.07

-0.60 -0.50 -0.40 -0.30 -0.20 -0.10 0.00 0.10 0.20 0.30 0.40 0.50 0.60

Slika 23. Povezanost profila kemokinskih receptora i koncentracije kemokina s kardiometaboličkim parametrima u pretilih bolesnika.

Prikazani su smjer i jačina korelacije koncentracije pojedinog kemokina (CCL2, CCL5, CXCL10, CXCL11, CXCL12) odnosno izražaja kemokinskih receptora (CCR2, CCR4, CXCR3, CXCR4) na populacijama mononuklearnih stanica periferne krvi (monocita CD14+, limfocita B CD19+ i limfocita T CD3+) s kardiometaboličkim rizičnim čimbenicima koji uključuju obilježja bolesti, krvni tlak, lipidogram, jetrenu i bubrežnu funkciju te s parametrima upale. Stanice periferne krvi koje izražavaju kemokinske receptore određene su metodom protočne citometrije, a koncentracije kemokina određene su metodom protočne citometrije pomoću mikrokuglica (CCL2, CCL5, CXCL10, CXCL11) ili ELISA (CXCL12). Povezanost je ispitana koristeći korelaciju ranga te su prikazani Spearmanovi koeficijenti korelacije (ρ) koji su kodirani bojom te crveni spektar predstavlja negativne korelacije, a zeleni spektar pozitivne korelacije. Statistička značajnost određena je za $p < 0,05$ (u tablici deblje otisnuto). Na dnu slike nalazi se shema obojanih kodova raspona vrijednosti p . PRT – pretili ispitanici; DI – doza inzulina; SKT – sistolički krvni tlak; DKT – dijastolički krvni tlak; Uk-K – ukupni kolesterol; LDL-K – kolesterol u lipoproteinima niske gustoće, prema engl. low-density lipoprotein; HDL-K – kolesterol u lipoproteinima visoke gustoće, prema engl. high-density lipoprotein; TG – trigliceridi; AST – aspartat aminotransferaza; ALT – alanin aminotransferaza; ACR – omjer albumina i kreatinina u mokraći, prema engl. albumin to creatinine ratio; CRP – C-reaktivni protein; FIB – fibrinogen.

6. RASPRAVA

U svijetu se uočava porast prevalencije dvaju najčešćih oblika šećerne bolesti, tipa 1 i tipa 2, i to već u pedijatrijskoj populaciji (3, 30, 97, 98). Međunarodna dijabetička federacija, IDF, procjenjuje da od šećerne bolesti u svijetu boluje više od milijun djece i adolescenata s povećanjem broja za oko 120 tisuća svake godine (3, 97). Prije tridesetak godina šećerna bolest tipa 2 bila je isključivo bolest odraslih, no zadnjih desetljeća sve je više oboljelih adolescenata te se procjenjuje da ih u SAD ima više od 20 tisuća (97, 99). Istovremeno, s razvojem pandemije pretilosti već od najranije dobi, procjenjuje se da gotovo 5% djece rane školske dobi, od 6 do 10 godina starosti, razvija predijabetes (31).

Takva epidemiološka slika posljedica je globalnog usvajanja „zapadnjačkog“ stila života. Djeca se sve manje kreću, a kalorijski unos značajno je veći od potrošnje. Pretilost je uzročni čimbenik razvoja šećerne bolesti tipa 2, no sve veći broj djece sa šećernom bolešću tipa 1 također je pretilo (33, 100, 101). Takvo stanje otežava utvrđivanje tipa šećerne bolesti u dječjoj dobi, a vodi i uvođenju novih podtipova bolesti i novih termina koji ih definiraju, kao primjerice „hibridna“ šećerna bolest (102).

6.1. Kardiometabolički čimbenici rizika u djece sa šećernom bolešću tipa 1, pretile djece i zdravih ispitanika

Djetinjstvo i adolescencija ključna su razdoblja života kada se pojavljuju čimbenici rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Pojava spomenutih čimbenika rizika znatno je izraženija u djece koja boluju od šećerne bolesti ili pretilosti, a često su prisutni već kod postavljanja dijagnoze (101). Više od dva kardiometabolička čimbenika rizika opisana su u oko 92% djece i mladih sa šećernom bolešću tipa 2 te u 14% djece i mladih sa šećernom bolešću tipa 1 (33). Iako šećerna bolest dvostruko povećava rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti i pratećeg mortaliteta, uočeno je da hiperglikemija u djece nema takav značaj rizičnog čimbenika kao hiperglikemija u odraslih osoba (33, 103). Već u toj ranoj dobi prekomjerna tjelesna masa i opseg struka predstavljaju značajan čimbenik rizika te je rizik kardiovaskularnih bolesti u pretile djece znatno veći, posebno uzevši u obzir metaboličke posljedice koje ju prate (32-34).

Učeno je da je dislipidemija težeg stupnja u djece sa šećernom bolešću tipa 1 koja su pretila i imaju dobru regulaciju glikemije, nego u mršavih bolesnika s lošijom regulacijom bolesti (35). Uz hiperlipidemiju i povišen krvni tlak, kao čimbenik rizika posebno se izdvaja inzulinska rezistencija. Ona je dio patofiziološkog mehanizma nastanka šećerne bolesti tipa 2, no sve je češće uočavamo i u djece sa šećernom bolešću tipa 1, posebice u adolescentica (102, 104, 105). Više spomenutih entiteta grupiranih oko abdominalnog tipa pretilosti i inzulinske rezistencije čine metabolički sindrom, koji pak predstavlja iznimno važan kardiometabolički čimbenik rizika koji je rezultat umnoška, prije nego zbroja rizika pojedinih entiteta koji ga čine. U naših je pretilih ispitanika gotovo 40% djece zadovoljavalo kriterije za metabolički sindrom, što posebice zabrinjava ako uzmemo u obzir da je metabolički sindrom u djece udružen sa značajnijim razvojem subkliničke ateroskleroze već u dječjoj dobi te, posljedično, sa značajnim rizikom napredovanja prema simptomatskoj kardiovaskularnoj bolesti u odrasloj dobi (106). Tome se sindromu pribrajaju i često ga prate promjene na jetri u vidu steatoze (MASLD prema engl. *metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease*, ranije poznatu kao NAFLD, prema engl. *non-alcoholic fatty liver disease*) te mikroalbuminurija, koja se smatra neovisnim čimbenikom rizika za razvoj kardiovaskularnih incidenata (35, 101, 107).

6.1.1. Dislipidemija

Analizom metaboličkih čimbenika rizika za razvoj bolesti srca i krvnih žila uočili smo značajne razlike u lipidnom profilu među skupinama. Djeca oboljela od šećerne bolesti imala su značajno više koncentracije ukupnog kolesterola u odnosu na druge dvije skupine ispitanika, dok su koncentracije LDL-kolesterola i triglicerida bile povišene u obje skupine bolesnika, u djece sa šećernom bolešću i u djece s pretilošću, u odnosu na zdrave ispitanike. S druge strane pretili ispitanici imali su značajno niže koncentracije HDL-kolesterola u odnosu na druge dvije skupine.

Dislipidemija u djece sa šećernom bolešću i pretilošću, iscrpno je istraživana i opisivana tema. Prevalencija dislipidemije u djece sa šećernom bolešću tipa 1 kreće se od oko 26% do preko 60%, koliko je procijenjeno u studiji Noras i suradnika analizom lipidograma 565 oboljele djece u Bangladešu (35, 108). Najučestaliji poremećaj u metabolizmu lipida bila je hiperkolesterolemija u 63,5% djece, praćena i granično povišenim koncentracijama LDL-kolesterola u 34,2% oboljelih (35). Rezultati našeg istraživanja u skladu su s ranije opisanim nalazima te u djece sa šećernom bolešću tipa 1 prevladavaju povišene koncentracije ukupnog

kolesterola i LDL-kolesterola. Tako je čak 54,8% djece i mladih sa šećernom bolešću imalo povišene koncentracije ukupnog kolesterola, a 25,8% imalo je povišen LDL-kolesterol. Uz navedeno, manje od 10% tih bolesnika imalo je snižene koncentracija HDL-kolesterola, dok su povišene koncentracije triglicerida uočene u 12,9% djece sa šećernom bolešću. Naši rezultati tako su u skladu i s rezultatima velike prospektivne studije „*SEARCH for Diabetes in Youth*“, koja uključuje 1.800 djece i mladih sa šećernom bolešću, a prema kojoj je 9,1 do 17,5% djece sa šećernom bolešću imalo snižene koncentracije HDL-kolesterola, a 6,7 do 11,1% hipertrigliceridemiju (32). Osim granično značajne pozitivne korelacije udjela HbA1c s koncentracijom triglicerida, nismo uočili statistički značajnu korelaciju metaboličke kontrole bolesti iskazane kroz HbA1c s ostalim metaboličkim parametrima, trajanjem bolesti ili krvnim tlakom. Starija dob u naših je ispitanika bila statistički značajno pozitivno povezana s višom koncentracijom ukupnog kolesterola.

Prema podacima proizišlim iz baze podataka međunarodnog projekta „*SWEET*“ (prema engl. „*Better control in Pediatric and Adolescent diabeteS: Working to crEate CEnters of Reference*“), posvećenog poboljšanju skrbi za djecu sa šećernom bolešću tipa 1, kao i studije „*SEARCH for Diabetes in Youth*“, potvrđena je povezanost dislipidemije (prije svega povećanje koncentracija LDL-kolesterola i niža koncentracija HDL-kolesterola) s prirastom na tjelesnoj masi i metaboličkom kontrolom šećerne bolesti, čimbenicima rizika na koje je moguće voljno djelovati (32, 100, 109).

U pretilu djece sa šećernom bolešću tipa 1 opisan je fenotip koji se smatra izrazito aterogenim, a karakteriziran je hipertrigliceridemijom i povećanim opsegom struka (engl. „*hypertriglyceridemic waist phenotype*“). Uz prekomjernu tjelesnu težinu odnosno pretilost te hipertrigliceridemiju, spomenuti lipidni profil uključuje i povišene koncentracije ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola te prema skupini brazilskih znanstvenika predstavlja korelat metaboličkom sindromu, a opisan je u 23,5% djece i adolescenata sa šećernom bolešću tipa 1 (110). Istraživanjem Szadkowske i suradnika uočeno je da je dislipidemija u djece sa šećernom bolešću češće pratila pretilost nego lošu kontrolu bolesti, a prema podacima studije „*SEARCH for Diabetes in Youth*“, gotovo je trećina djece sa šećernom bolešću tipa 1 u uključenim državama SAD-a imala prekomjernu tjelesnu težinu ili je bila pretila (32, 111).

Iako su iz naše studije bila isključena djeca i adolescenti oboljela od šećerne bolesti tipa 1 s prekomjernom tjelesnom težinom ili pretilošću, u našoj skupini djece sa šećernom bolešću uočili smo značajno više koncentracije triglicerida u odnosu na zdrave ispitanike, uz povišene koncentracije ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola. U skladu s rezultatima studije

„SEARCH“ i projekta „SWEET“, prosječna koncentracija HDL-kolesterola je u skupini djece sa šećernom bolešću bila statistički značajno viša od koncentracija u ostale dvije skupine (32, 100, 109).

U pretile djece opisan je tipičan obrazac dislipidemije s povišenom koncentracijom triglicerida, sniženom koncentracijom HDL-kolesterola te granično povišenim koncentracijama ukupnog kolesterola i LDL kolesterola (112). Prema izvješćima nacionalnog programa praćenja zdravlja i prehrane u SAD, nazvanom *NHANES* (prema engl. „*National Health and Nutrition Examination Survey*“), 42,9% pretile djece ima takav profil dislipidemije, a i naši rezultati mogu se uklopiti u spomenuti profil. Tako je čak 54,6% pretile djece u našem istraživanju imalo snižene koncentracija HDL-kolesterola, dok je ukupni kolesterol bio povišen u 21,2% pretilih, LDL-kolesterol u 18,2% pretilih, a 15,2% pretilih je imalo povišenu koncentraciju triglicerida. Prosječne vrijednosti triglicerida i LDL-kolesterola bile su statistički značajno više u pretile djece nego u zdravih ispitanika, dok je prosječna koncentracija HDL-kolesterola u toj skupini ispitanika bila statistički značajno niža u odnosu na zdrave ispitanike i ispitanike sa šećernom bolešću. Takav patološki obrazac dislipidemije u djece s težim stupnjem pretilosti, prije svega sa sniženim koncentracijama HDL-kolesterola i povišenim koncentracijama triglicerida, prikazan je u meta-analizi 320 znanstvenih članaka koji su izvještavali o kardiometaboličkim rizicima u pretile djece (23). Prema analizi izvješća čak je 67 do 86% pretile djece imalo barem jedan kardiometabolički čimbenik rizika, a uz dislipidemiju, u znatnom udjelu (40 do 60%), imali su i steatozu jetre. U naših je ispitanika povišena koncentracija enzima ALT, koja upućuje na steatozu jetre, uočena u 35,3% pretile djece, dok je omjer enzima AST i ALT vrijednosti manje od jedan zabilježen u 50% djece iz te skupine ispitanika. Udio pretile djece koja imaju MASLD pokazao se znatnijim i u drugim studijama te se smatra jednom od prvih metaboličkih komplikacija pretilosti koje se vide u djece, a ujedno je i najčešća kronična bolest jetre s rizikom za razvoj steatohepatitisa i posljedične fibroze (107, 113-116). Povezanost nalaza s inzulinskom rezistencijom, upalom te endotelnom disfunkcijom čine steatozu jetre potencijalnim entitetom metaboličkog sindroma (107, 115, 117).

6.1.2. Inzulinska rezistencija

Zajednički temelj koji vodi razvoju dislipidemije, steatoze jetre i, konačno, poremećaja metabolizma glukoze čini inzulinska rezistencija, koja pospješuje metaboličke poremećaje i

vodi razvoju metaboličkih komplikacija u pretilih osoba. Kao rezultat inzulinske rezistencije, u jetru je povećan dotok neesterificiranih slobodnih masnih kiselina potrebnih za sintezu triglicerida te sekvestraciju u lipoproteine bogate trigliceridima. Trigliceridi se potom ugrađuju u male, guste LDL-čestice te male, nestabilnije HDL-čestice, dovodeći do povećanja koncentracije LDL-kolesterola te smanjenja koncentracije HDL-kolesterola (112). Istovremeno, inzulinska rezistencija pogoduje nakupljanju lipida u hepatocitima, dovodeći do razvoja steatoze jetre. Posljedični suvišak masnih kiselina, oksidativni stres, deplecija adenozin-trifosfata i mitohondrijska disfunkcija mogli bi biti razlogom oštećenja hepatocita u jetri prožetoj mastima (114, 115).

U našoj je skupini pretilih ispitanika čak 79,4% imalo laboratorijske znakove inzulinske rezistencije, a sukladno ulozi tog čimbenika u metaboličkim poremećajima opisanim u pretiloj djece, vrijednosti HOMA-IR su statistički značajno pozitivno korelirale s vrijednostima ITM, ali i s gotovo svim analiziranim metaboličkim čimbenicima rizika: ukupnim kolesterolom, LDL-kolesterolom, trigliceridima, enzimom ALT te stupnjem albuminurije izraženim omjernom albumina i kreatinina u prvom jutarnjem urinu, uz statistički značajnu negativnu korelaciju s koncentracijom HDL-kolesterola. Mikroalbuminurija je također prepoznata komplikacija metaboličkog sindroma i smatra se neovisnim prediktorom kardiovaskularnih bolesti i mortaliteta u oboljelih od šećerne bolesti, ali i u nedijabetičnih osoba, te je predložena kao biljeg probira za osobe s visokim rizikom od kardiovaskularnog incidenta (113). U skupini pretilih ispitanika u našem istraživanju dvoje je djece imalo značajnu albuminuriju, a vrijednosti omjera albumina i kreatinina bile su statistički značajno više nego u zdravih ispitanika i bolesnika sa šećernom bolešću. Naime, uz značajan rizik od makrovaskularnih komplikacije smatra se da inzulinska rezistencija ima ulogu i u etiologiji mikrovaskularnih promjena (105).

Inzulinska rezistencija u mladima sa šećernom bolešću tipa 1 klinički je skrivena (105), no udružena je s ranom pojavom promjena u stijenci krvnih žila. Prvi znakovi promjena u strukturi i funkciji velikih krvnih žila (karotidnih arterija) često su prve komplikacije koje se mogu dokazati u djece sa šećernom bolešću (43, 44, 49, 118). Povećanje vrijednosti ITM u te djece praćeno je metaboličkim promjenama, prije svega u lipidogramu, te pojačanom inzulinskom rezistencijom i težom regulacijom glikemije, što je izraženije u djevojčica nego u dječaka (43, 105, 119). Takve promjene u konačnici mogu voditi gubitku zaštitnog učinka ženskog spola na razvoj kardiovaskularnih bolesti (11).

U konačnici, čini da je već u dječjoj dobi pretilost značajniji faktor rizika za razvoj albuminurije i kardiovaskularne bolesti nego sama šećerna bolest, neovisno o metaboličkoj kontroli bolesti. Naša zapažanja u skladu su s izvješćem o kardiometaboličkim rizicima u djece sa šećernom bolešću tipa 1 u poljskoj studiji (111).

6.1.3. Hipertenzija

Značajan kardiorizični čimbenik u svim dobnim skupinama je i arterijska hipertenzija. Razvoj arterijske hipertenzije usko je povezan s razvojem i tijekom šećerne bolesti tipa 1 s kojim dijeli iste patofiziološke mehanizme kao što su oksidativni stres, upala, aktivacija imunostnog sustava te pojačana aktivnost sustava renin – angiotenzin – aldosteron (120). U takvom okružju, razvoju arterijske hipertenzije znatno pogoduje i povećanje krutosti arterijske stijenke što je jedan od ranih biljega endotelne disfunkcije, odnosno promjena u funkciji stijenke velikih krvnih žila koje možemo klinički procijeniti (121). Pritom su studije s višegodišnjim praćenjem pokazale utjecaj povišenog udjela HbA1c na progresiju promjena u stijenci krvnih žila (prije svega debljine sloja intima-medija stijenke karotidne arterije, cIMT prema engl. *carotid intima-media thickness*), uz značajnu povezanost promjena s trajanjem šećerne bolesti, krvni tlakom i vrijednostima ITM (122). Uočena je i povezanost oblika terapije i udjela HbA1c u ranijoj fazi šećerne bolesti s kasnijom pojavom i progresijom bolesti krvnih žila, što se opisuje kao „metabolička memorija“. Smatra se da patofiziološku podlogu takve „odgođene“ reakcije na stupanj glikemije čini formiranje „dugo-živućih“ spojeva AGE, odnosno glikacija proteina u strukturi krvnih žila koja potom izravno utječe na njihovu funkciju (37, 123). U studiji „*SEARCH*“, u djece i adolescenata sa šećernom bolešću opisana je pozitivna korelacija kardiometaboličkih čimbenika rizika, uključujući arterijsku hipertenziju, s ultrazvučnim parametrima krutosti arterijske stijenke: indeksom krutosti arterijske stijenke te indeksom augmentacije (109). Slični rezultati dobiveni su u studiji provedenoj u Klinici za pedijatriju, KBC Zagreb, gdje su u djece sa šećernom bolešću tipa 1 uočene značajne promjene u parametrima krutosti krvožilne stijenke (krutost arterijske stijenke, brzina pulsnog vala i popustljivost arterijske stijenke), koje su upućivale na povećanu krutost stijenke karotidne arterije. U navedenoj studiji nije uočena razlika u debljini intima-medija sloja stijenke karotidne arterije (cIMT), što bi moglo značiti da se funkcionalne promjene krvožilne stijenke mogu uočiti i prije prvih klinički uočljivih morfoloških promjena. U djece sa šećernom bolešću krutost arterijske stijenke također je pozitivno korelirala s poznatim kardiometaboličkim

čimbenicima rizika, s trajanjem bolesti, udjelom HbA1c, vrijednošću ITM i s krvnim tlakom (49).

S druge strane, pretilost, posebice ako je praćena suviškom visceralnog masnog tkiva, jedan je od vodećih uzorka hipertenzije te predstavlja 65 do 75% rizika za razvoj primarne hipertenzije. Razvoju hipertenzije u pretilosti pogoduju fizički pritisak okolnog masnog tkiva na bubrege, aktivacija sustava renin – angiotenzin – aldosteron, pojačana aktivnost autonomnog simpatičkog sustava, ali i upalno stanje, oskidativni stres i inzulinska rezistencija. Te promjene započinju lučenjem citokina iz adipocita u hipertrofičnom masnom tkivu te pogoduju funkcijskim i strukturnim promjenama krvnih žila, ali i bubrega, koji se tako upliću u patofiziološki proces (124). Stoga i razvoj pretilosti značajno pridonosi razvoju krutosti stijenke krvnih žila, što vodi progresivnom povećanju vrijednosti krvnog tlaka već od dječje dobi (125).

U našoj studiji, kao surogat biljeg za procjenu funkcije krvožilne stijenke i rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti, koristili smo mjerenje krvnog tlaka. Čak i tim, bazičnim kliničkim parametrom, dobili smo značajne i zabrinjavajuće rezultate. Prosječne vrijednosti sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka bile su najviše u skupini pretile djece te su se statistički značajno razlikovale u odnosu na zdrave ispitanike. Čak 45,5% pretile djece, ali i 32,2% djece sa šećernom bolešću imalo je povišen sistolički krvni tlak, dok je povišen dijastolički krvni tlak opisan u 48,5% pretile djece i 25,8% djece sa šećernom bolešću. Udio djece s povišenim krvnim tlakom u naših ispitanika u skladu je s izvješćem studije „*SEARCH for Diabetes in Youth*“ za pretilu djecu sa šećernom bolešću tipa 2, no viši je od ranijih izvješća koja su uglavnom podudarna, a kreću se u rasponu od 9 do 17% u pretile djece te u nešto manjem postotku u djece sa šećernom bolešću (23, 32).

6.2. Upalni parametri u djece sa šećernom bolešću tipa 1, pretile djece i zdravih ispitanika

Smatra se da slični upalni patofiziološki mehanizmi pokrenuti hiperglikemijom ili pretilošću, koji vode razvoju mikrovaskularnih komplikacija, imaju ulogu i u razvoju promjena na velikim krvnim žilama. Glavne postavke ove studije temelje se na saznanju da kronični blagi upalni proces sudjeluje u razvoju aterosklerotskih promjena na krvnim žilama te da mu pogoduju prekomjerna tjelesna težina, odnosno pretilost i hiperglikemija. Nakon što smo opisali značajne razlike u postojanju kardiometaboličkih čimbenika rizika u djece sa šećernom

bolešću i u pretilo djece, u skladu sa zadanim ciljem, usporedili smo i koncentracije upalnih biljega među skupinama te analizirali povezanost upale i ranije opisanih kardiometaboličkih čimbenika rizika. I na razini najčešće mjenog, rutinskog upalnog parametra CRP moguće je uočiti razliku između osoba u riziku za razvoj ateroskleroze zbog postojanja kardiometaboličkih čimbenika rizika i onih koji te čimbenike rizika nemaju. Isto je dokazano i analizom drugih upalnih pokazatelja, primjerice citokina IL-4, TNF- α i adiponektina (118, 126).

6.2.1. C-reaktivni protein

Biljeg CRP se kroz mnogobrojne prospektivne studije pokazao ponovljivim čimbenikom koji objedinjuje brojne metaboličke rizike i upalno stanje (1, 126-128). Stoga se smatra čimbenikom rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti u odraslih te je kao neovisni čimbenik rizika dodan u procjenu rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti prema Framinghamskom indeksu rizika (engl. „*Framingham Risk Score*“) (129). Prema rezultatima meta-analiza, biljeg CRP se smatra boljim prognostičkim čimbenikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti od hipertenzije ili hiperkolesterolemije (130). Osim prepoznate uloge blago povišenih koncentracija serumskog parametra CRP kao biljega koronarne bolesti i rizika od kardiovaskularnih incidenata, smatra se da CRP i izravno sudjeluje u razvoju, odnosno napredovanju ateroskleroze (131).

Pokazano je da u osoba sa šećernom bolešću fluktuacije glikemije te sama hiperglikemija pogoduju razvoju i održavanju upalnog stanja, a proizašao upalni odgovor i oksidativni stres imaju izravnu ulogu u aterogenezi te napredovanju promjena do klinički očite kardiovaskularne bolesti. U našem istraživanju uočena je statistički značajna razlika u koncentraciji biljega CRP među promatranim skupinama, što je u skladu s rezultatima brojnih studija koje su uključivale odrasle bolesnike sa šećernom bolešću tipa 1 (1, 132, 133), no i s manjim brojem studija provedenih u djece sa šećernom bolešću (118, 128, 134). Tako su pojačanu upalnu aktivnost mjerenu koncentracijom CRP opisali Zhang i suradnici, koji su uz višu koncentraciju biljega CRP uočili i više koncentracije citokina TNF- α , IL-4 i leptina u djece sa šećernom bolešću (118). Trostruko veću koncentraciju biljega CRP u djece sa šećernom bolešću tipa 1 u odnosu na zdrave ispitanike opisali su Coulon i suradnici (134). U ispitanika koji su uz šećernu bolest imali i mikrovaskularne komplikacije, koncentracija je bila peterostruko viša nego u zdravih ispitanika. Povišene koncentracije biljega CRP, uz povišene

koncentracije adiponektina, u djece i adolescenata sa šećernom bolešću tipa 1 opisali su i Goksen i suradnici predlažući te parametre kao neinvazivnu metodu probira na kardiovaskularne komplikacije (126). U djece i adolescenata sa šećernom bolešću u navedenom istraživanju koncentracija biljega CRP korelirala je s trajanjem bolesti, koncentracijom LDL-kolesterola te vrijednostima ITM (126). Usporedivi rezultati dobiveni su analizom podataka i u našem istraživanju, gdje je uočena statistički značajna pozitivna korelacija biljega CRP s koncentracijom LDL-kolesterola, vrijednostima ITM te s dobi ispitanika.

S druge strane, više studija koje su istraživale upalno stanje i prve promjene u stijenkama krvnih žila, kao rane biljege aterosklerotskih promjena u djece sa šećernom bolešću, nije opisalo razlike u koncentracijama biljega CRP u usporedbi sa zdravim vršnjacima (105, 128). Iako nije uočena razlika u koncentraciji biljega CRP među skupinama, uočena je, sukladno drugim istraživanjima, pozitivna korelacija koncentracija biljega CRP s tjelesnom težinom i vrijednostima ITM u djece sa šećernom bolešću te je zaključeno da povećana tjelesna težina u djece dodatno pridonosi upalnom odgovoru te time povećava kardiovaskularni rizik (128).

Brojne su se studije bavile proučavanjem upalne aktivnosti u pretilo djece i adolescenata, a rezultati studija su konzistentniji. Koncentracije biljega CRP više su u pretilo djece i adolescenata u odnosu na njihove zdrave vršnjake, a korelacija tog upalnog pokazatelja s brojnim metaboličkim poremećajima upućuje na ulogu upale kao okosnice koja povezuje pretilost, inzulinsku rezistenciju, povišen krvni tlak i rizik od kardiovaskularnih bolesti (135-138).

Sve je više dokaza da potkožno masno tkivo nije samo nakupina hipertrofičnih masnih stanica, već da se radi o aktivnom endokrinom i parakrinom organu koji među ostalim luči niz upalnih citokina. Jedan od njih je IL-6 koji potiče sintezu biljega CRP u jetri (138). Lučeći se u jetri, ali i u masnom tkivu u ovisnosti o citokinima, CRP ima klasičnu ulogu pokazatelja upale, u konkretnom slučaju blage i kronične upale koja vodi funkcionalnim i strukturnim promjenama u stijenci krvnih žila. Pritom se smatra da su vrijednosti biljega CRP iznad 3 mg/L povezane s većim kardiovaskularnim rizikom, a takve se nalaze u oko trećine pretilo djece (135, 137). Istovremeno, uočeno je da se CRP lako povezuje s LDL-kolesterolom te pospješuje njegovo taloženje u stijenci krvnih žila, čime izravno potiče stvaranje aterosklerotskih plakova (139).

U našem je istraživanju koncentracija biljega CRP bila najviša u skupini pretilo djece te je bila statistički značajno viša u odnosu na zdrave ispitanike. U skupini pretilo djece više od

32% djece imalo je biljeg CRP viši od 3 mg/L. To je u skladu s rezultatima ranije spomenutih, ali i drugih studija koje su uključivale djecu različitih dobnih skupina. Tako su Salgado-Bernabé i suradnici te Carmona-Montesinos i suradnici utvrdili značajno višu koncentraciju biljega CRP u pretile djece već u predškolskoj dobi i to u one s centralnim i s perifernim tipom pretilosti (135, 137, 138).

Među pretilom djecom, kao posebna rizična skupina izdvajaju se djeca s elementima metaboličkog sindroma. Ona se smatraju najizloženijima višestrukim kardiometaboličkim rizicima, a ulogu metaboličkog sindroma kao rizičnog čimbenika u razvoju kardiovaskularnih bolesti prati i značajnije povišena koncentracija biljega CRP. Meta-analize više studija upućuju na udio metaboličkog sindroma od 29,2% među pretilom djecom, dok se elementi metaboličkog sindroma nalaze i u oko 11,9% djece s prekomjernom tjelesnom težinom (140, 141). U istraživanju Soriano-Guillen i suradnika, 24% pretile djece je imalo metabolički sindrom, a u te je djece biljeg CRP bio značajno viši nego u pretile djece koja nisu imala elemenata metaboličkog sindroma (136). Osim u koncentraciji biljega CRP ta su se djeca razlikovala i prema koncentracijama inzulina, triglicerida, urata te HDL-kolesterola, s time da su nepovoljniji kardiometabolički čimbenici bili izraženiji u djece s metaboličkom sindromom. Slične rezultate objavila je i grupa autora na čelu s Vassilopoulou (140).

U naših je pretilih ispitanika njih preko 39% zadovoljavalo kriterije za dijagnozu metaboličkog sindroma prema definiciji Međunarodne dijabetičke federacije (IDF), što je nešto više u odnosu na ranije spomenute studije (96). Pretpostavljamo da je takav rezultat uzrokovan činjenicom da se u Kliniku češće upućuju djeca s većim stupnjem pretilosti ili s već prisutnim metaboličkim komplikacijama. Iako su djeca s metaboličkim sindromom imala statistički značajno viši stupanj inzulinske rezistencije, ta se skupina djece, usprkos očekivanjima, nije statistički značajno razlikovala od ostale pretile djece prema koncentracijama upalnih biljega CRP i fibrinogen. Vjerujemo da je to posljedica relativno malog broja ispitanika u tako definiranoj podgrupi pretilih te već ranije spomenutog načina uključivanja pretilih u istraživanje.

U naših je ispitanika koncentracija biljega CRP statistički značajno pozitivno korelirala s vrijednostima HOMA-IR, a uočena je i statistički značajna povezanost pokazatelja upale i vrijednosti HOMA-IR s ostalim kardiorizičnim čimbenicima i elementima metaboličkog sindroma. Tako je uočena statistički značajna pozitivna korelacija s vrijednostima ITM, koncentracijama ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola, triglicerida i enzima ALT te negativna povezanost s koncentracijom HDL-kolesterola. Naši su rezultati, dakle, u skladu s ranije

opisanim saznanjima o ulozi inzulinske rezistencije kao poveznice različitih elemenata metaboličkog sindroma, u čijem patofiziološkom procesu važnu ulogu ima oksidativni stres induciran nakupljanjem slobodnih masnih kiselina kao i sama upalna reakcija (113). Pritom rezultati sličnih studija jednoznačno upućuju na ranije prepoznatu ulogu serumskih vrijednosti parametra CRP kao biomarkera kardiovaskularnih komplikacija koje prate metabolički sindrom (28, 29, 64, 113, 138, 140).

U skladu s navedenim, kao u djece sa šećernom bolešću, i u pretilo se djece upalni pokazatelji i kardiometabolički faktori rizika povezuju s endotelnom disfunkcijom i strukturnim promjenama krvnih žila te je serumski parametar CRP predložen kao koristan biljeg ranih znakova ateroskleroze u pretilo djece (25, 28, 29).

Važno je na kraju istaknuti da regulirana prehrana i redukcija tjelesne težine rezultiraju smanjenjem koncentracije biljega CRP čak i neovisno o promjeni vrijednosti ITM (27, 138).

6.2.2. Fibrinogen

Uz biljeg CRP u našem istraživanju određivali smo i koncentraciju fibrinogena kao upalnog pokazatelja. Fibrinogen u kontekstu razvoja šećerne bolesti, odnosno metaboličkih, upalnih i krvožilnih posljedica hiperglikemije ima višestruku ulogu. On je također jedan od proteina akutne faze upale, no njegova osjetljivost i značenje čine se drugačijima u odnosu na biljeg CRP, pa povišena koncentracija fibrinogena može upućivati na prve znakove endotelne disfunkcije u osoba sa šećernom bolešću i u pretilih. Tako je, primjerice, uočena značajna povezanost koncentracije fibrinogena s mikroalbuminurijom te je fibrinogen prepoznat kao marker dijabetičke nefropatije i bolesti perifernih krvnih žila (142). Osim navedenog, fibrinogen je jedan od važnih elemenata procesa hemostaze u ljudskom organizmu, a utječe i na viskoznost plazme i agregaciju eritrocita, nepovoljno djelujući na mikrocirkulaciju i prateće oštećenje endotela te posljedičnu sklonost trombozi (143). Smatra se da fibrinogen i izravno pridonosi razvoju i aktivaciji ateromatoznih plakova (144, 145). Uspoređivanje koncentracije fibrinogena u djece sa šećernom bolešću tipa 1 bez komplikacija i njihovih zdravih vršnjaka dalo je nekonzistentne rezultate. Rezultati studije „*SEARCH*“ pokazali su da se već u adolescentnoj dobi prati značajno pogoršanje parametara krutosti i zadebljanja arterijske stijenke te da isti značajno koreliraju s koncentracijama fibrinogena (146).

U naših bolesnika koncentracija fibrinogena nije se statistički značajno razlikovala između skupine djece sa šećernom bolešću i kontrolne skupine ispitanika, što je oprečno ranije spomenutim studijama (142, 144). Pretpostavljamo da je razlog tome izostanak kasnih komplikacija šećerne bolesti u naših ispitanika. U skladu s navedenim, izostanak razlike u koncentracijama fibrinogena opisali su i Zhang i sur (118).

S druge strane, koncentracije fibrinogena bile su statistički značajno više u pretiloj djece, i to u odnosu na zdravu djecu, ali i u odnosu na djecu sa šećernom bolešću što je u skladu s rezultatima više provedenih istraživanja (25, 143, 147).

Koncentracije fibrinogena u naših su ispitanika statistički značajno pozitivno korelirale s parametrima metaboličkog sindroma te s albuminurijom, dok je izostala statistički značajna korelacija s pokazateljima kontrole glikemije. Takvi su rezultati u skladu s rezultatima istraživanja u pretiloj djece u kojih je koncentracija fibrinogena bila značajno viša u pretiloj djece u odnosu na kontrolnu skupinu te je korelirala s vrijednostima ITM i koncentracijom biljega CRP te kardiometaboličkim čimbenicim rizika (dijastoličkim krvnim tlakom, koncentracijom enzima ALT te s omjerom albumina i kreatinina u mokraći) (143, 147).

6.3. Kemokini i kemokinski receptori u djece sa šećernom bolešću tipa 1 i u pretiloj djece

Šećerna bolest tipa 1 i pretilost dva su nozološki potpuno različita entiteta, različite etiologije i tijeka bolesti, no patofiziološki procesi koji vode njihovim metaboličkim komplikacijama, endotelnoj disfunkciji i, konačno, promjenama u stijenci krvnih žila dijelom se preklapaju te su u obje bolesti posredovane razvojem subkliničkog kroničnog upalnog stanja. Ipak, ishodište upalnog procesa u ove dvije bolesti je različito, a čini se da se i u kasnijem tijeku regulatorni mehanizmi upale, upalni medijatori i regrutirane upalne stanice znatno razlikuju. Tako je moguće uočiti i razlike u fenotipu pojedinih imunosnih stanica, odnosno u udjelima aktiviranih stanica koje izražavaju gene za pojedine upalne medijatore, citokine i kemokine te njihove receptore (60, 148-156). Promjene u udjelima pojedinih upalnih i imunosnih stanica u perifernoj krvi dijelom su posljedica razlika u čimbenicima koji reguliraju stvaranje i otpuštanje pojedinih staničnih subpopulacija iz limfnih organa u cirkulaciju, a dijelom i nakupljanja upalnih stanica specifičnih značajki u pojedinim, upalom zahvaćenim ciljnim tkivima i organima. U osoba sa šećernom bolešću to se događa na mjestima podložnih tkiva, kao što je

endotel malih krvnih žila očne pozadine, glomerula te područje glije, kao i subendotelni prostor velikih krvnih žila. U pretilih osoba nakupljanje upalnih stanica dokazano je i u masnom tkivu, posebice u visceralnom masnom tkivu, gdje upalni proces igra važnu ulogu u razvoju metaboličkih komplikacija pretilosti (55, 148, 157-160).

Literaturni podaci o udjelu populacija imunosnih stanica, kao i njihovim subpopulacijama koje izražavaju pojedine receptore za uključene proupalne molekule još su dosta oskudni i neujednačeni, posebice oni koji opisuju stanje u djece. Dok je moguće naći izvješća o udjelima i ulozi limfocita T i monocita u tkivima i perifernoj krvi oboljelih od šećerne bolesti, manje i u pretilih, uloga limfocita B još se otkriva te je sve više dokaza o važnoj imunomodulatornoj ulozi tih stanica (161, 162).

6.3.1. Imunosne populacije

U našoj je studiji, u djece sa šećernom bolešću tipa 1 udio monocita bio statistički značajno viši u odnosu na kontrolnu skupinu, što je u skladu s pretpostavljenim pridruženim upalnim stanjem. S druge strane, udio limfocita T bio je statistički značajno viši nego u pretiloj djece, no nije se statistički značajno razlikovao u odnosu na kontrolnu skupinu. Povišen udio limfocita B uočeni u pretiloj djece može upućivati na ulogu humoralne imunosti u imunopatofiziologiji kardiometaboličkih komplikacija.

Naši su rezultati tek dijelom u skladu s ranije opisanim studijama, prije svega jer se i rezultati dosadašnjih istraživanja znatno razlikuju. Tako je povišen udio monocita u skupini djece s novootkrivenom šećernom bolešću tipa 1 ($n = 54$) uočeni u studiji Ren i suradnika (163). I u studiji Devaraj i suradnika, koja je uključivala mlade sa šećernom bolešću tipa 1 trajanja duljeg od jedne godine ($n = 52$), opisana je pojačana aktivnost monocita (164). S druge strane, Oras i suradnici su našli usporediv udio monocita u djece s novootkrivenom šećernom bolešću i u kontrolnih ispitanika. Za razliku od ispitanika uključenih u navedene studije, naši su ispitanici imali dulje trajanje šećerne bolesti (medijan 10 godina), što može biti uzrokom razlika u udjelu pojedinih imunosnih stanica (149).

U skladu s našim rezultatima, usporediv udio limfocita T u djece sa šećernom bolešću i u zdrave djece uočeni su u studiji koja je uključivala djecu sa šećernom bolešću tipa 1 trajanja duljeg od tri godine (165, 166). U potonjoj studiji opisan je, kao i u naših ispitanika, i usporediv udio limfocita B. Usporediv udio limfocita B opisan je i u studijama Oras i suradnika te

Wadenpohl i suradnika, no u te je djece uočen značajno viši udio limfocita T (149, 151). U djece sa šećernom bolešću tipa 1 (n = 53) uključene u studiju Kurianowicz i suradnika uz povišen udio limfocita T uočen je i povišen udio limfocita B (60).

Studije koje su analizirale udio imunosnih stanica u perifernoj krvi pretile djece nisu opisale smanjen udio limfocita T, koji je uočen u našem istraživanju. Suprotno tome nalazu, Schipper i suradnici našli su povišen udio limfocita T analizom imunosnih stanica u pretile djece (n=60), dok je u studiji Keusternas i suradnika udio limfocita T bio usporediv među skupinama, no u to je istraživanje bilo uključeno tek 13 pretile djece (160, 167). Ispitanici u navedenim studijama nešto su mlađi od naših te uključuju i djecu predpubertetske dobi, što bi moglo objasniti uočene razlike. S druge strane, u obje spomenute studije opisan je i povišen udio limfocita B, što je u skladu s našim nalazima te bi moglo upućivati na važnost humoralne imunosti u patofiziologiji pretilosti.

Značajne razlike u udjelima pojedinih imunosnih stanica među različitim skupinama ispitanika podupiru pretpostavljenu ulogu imunosnog sustava u patofiziologiji i tijeku promatranih bolesti, odnosno njihovih komplikacija, ali i upućuju na različitu regulaciju imunosnih procesa. Stoga smo u našem istraživanju išli korak dalje te smo analizirali plazmatske koncentracije kemokina kao i izražaj odgovarajućih kemokinskih receptora na mononuklearnim stanicama periferne krvi te njihovu povezanost s kardiometaboličkim čimbenicima rizika.

6.3.2. Kemokini i kemokinski receptori

Više je istraživanja koja otkivaju ulogu kemokina u primarno metaboličkim poremećajima poput šećerne bolesti i pretilosti, sugerirajući postojanje kroničnog upalnog stanja blagog intenziteta (168). Kompleksna mreža kemokina i kemokinskih receptora posreduje privlačenje efektorskih upalnih i imunosnih stanica u ciljna tkiva. Tako je uočeno da se specifične kombinacije kemokina mogu naći u pojedinim tkivima zahvaćenim različitim upalnim stanjima, no uzevši u obzir njihovu raznolikost i rasprostranjenost u raznim tkivima te parcijalnu redundanciju u vezanju na receptore, upitna je njihova uloga potencijalnih biomarkera. Ipak, dokaz promijenjenih koncentracija pojedinih kemokina i izražaja odgovarajućih receptora u određenim autoimunskim bolestima i upalnim stanjima upućuje na njihovu ulogu u patofiziologiji bolesti te ih čini mogućim ciljevima potencijalnih terapijskih pristupa (66, 85).

U našem je istraživanju uočena statistički značajno povišena koncentracija kemokina CCL2 i to u djece s lošom regulacijom šećerne bolesti, dok su koncentracije kemokina CXCL11 i CXCL12 bile snižene u skupinama bolesnika. Tako je koncentracija kemokina CXCL12 bila statistički značajno niža i u djece sa šećernom bolešću i u pretilih ispitanika, dok je koncentracija kemokina CXCL11 bila statistički značajno niža u pretilih bolesnika s težim stupnjem pretilosti. Ranije je uočeno da u dugotrajnim upalnim stanjima stvaranje kemokina nije uvijek nužno povišeno, ali i da cirkulirajuće koncentracije kemokina ne moraju vjerno odražavati stupanj njihova stvaranja u žarištima upale (65, 66, 87, 89). Istovremeno, ni fenotipizacija kemokinskih receptora na imunosnim stanicama u našoj studiji nije otkrila brojne razlike u profilu izražavanja među promatranim skupinama. Izražavanje kemokinskih receptora podliježe kompleksnoj regulaciji, posebice u stanju upale. Udio cirkulirajućih stanica koje izražavaju pojedine receptore ovisi o novačenju spomenutih stanica specifičnim ligandima u ciljna tkiva, prisutnosti „lažnih liganada“ ili atipičnih, solubilnih („*decoy*“) receptora, smanjenju razine izražaja receptora pod utjecajem upalnim medijatora ili internalizaciji kompleksa ligand/receptor nakon vezanja kemokina (33, 67, 87, 169). Zbog navedenog, u našem smo se radu usmjerili na interpretaciju povezanosti koncentracije kemokina i izražaja kemokinskih receptora s kardiometaboličkim čimbenicima rizika, u namjeri da utvrdimo specifične indikatore krvožilnih komplikacija.

Plazmatska koncentracija kemokina CXCL12 u naših je ispitanika bila statistički značajno niža u skupinama djece sa šećernom bolešću i u pretile djece u odnosu na skupinu zdravih ispitanika, dok je u skupini pretile djece uočen i statistički značajno veći udio limfocita B koji izražavaju odgovarajući kemokinski receptor CXCR4. Opisana je uloga kemokina CXCL12 u usmjeravanju migracije limfocita T u otočiće gušterače te u razvoju šećerne bolesti tipa 1 (85). Uloga spomenutog kemokina i pripadajućeg receptora CXCR4 u razvoju komplikacija šećerne bolesti tipa 1 za sada je kontroverzna. Naime, opisana biološka uloga kemokina CXCL12 uključuje održavanje viabilnosti pojedinih stanica i neoangiogenezu čime pridonosi popravku i regeneraciji oštećenog tkiva, no spomenuta funkcija može biti štetna u kontekstu razvoja dijabetičke retinopatije i nefropatije, gdje potiče progresiju bolesti (85, 170, 171). Na životinjskim modelima je uočeno da vezanje kemokina CXCL12 za receptor CXCR4 ima ulogu u razvoju bubrega te da je u dijabetičnih miševa u bubregu povećan izražaj receptora CXCR4. Isto je uočeno i u biopsijama bubrega osoba s dijabetičkom nefropatijom. Ipak, suprotno očekivanju, blokiranje receptora CXCR4 dodatno je pogoršalo albuminuriju u tih bolesnika kao i odumiranje tubularnih stanica u bubregu, poticanjem apoptoze. Ovi nalazi pak upućuju na moguću zaštitnu ulogu kompleksa CXCL12/CXCR4 u kontekstu razvoja

dijabetičke nefropatije (172, 173). S druge strane, istraživanje uloge spomenutog kemokina, odnosno kompleksa s odgovarajućim receptorom upućuje na dvojak ulogu i u razvoju i posljedicama koronarne bolesti, gdje se isprepliće njegova uloga u novačenju progenitorskih stanica i regeneraciji tkiva te uloga u poticanju upalne reakcije (85). I u pretilih je osoba opisana protektivna uloga kompleksa CXCL12/CXCR4 u razvoju kardiovaskularnih bolesti kao i snižena koncentracija tog kompleksa u pretilih osoba s razvijenom bolešću koronarnih arterija. S druge strane opisana je važna uloga kemokina CXCL12 u razvoju upale u masnom tkivu te u razvoju inzulinske rezistencije (77).

Naši rezultati također upućuju na značajnu ulogu kompleksa CXCL12/CXCR4 u patofiziologiji promjena koje se nalaze i u osoba sa šećernom bolešću i u pretilih osoba, i to već od dječje dobi. U naših su ispitanika koncentracije kemokina CXCL12 snažno, statistički značajno pozitivno korelirale s vrijednostima omjera albumina i kreatinina u urinu u djece sa šećernom bolešću te s metaboličkim parametrima (koncentracija glukoze u krvi, koncentracija enzima ALT, koncentracija triglicerida) u pretiloj djece, bez uočljivih značajnih korelacija u skupni zdravih ispitanika. Navedeni nalaz upućuje na moguću povezanost toga kemokina te metaboličkih i krvožilnih promjena u pretiloj djece i djece sa šećernom bolešću. Istovremeno, u obje skupine bolesne djece uočena je snažna, statistički značajna negativna korelacija svih subpopulacija mononuklearnih stanica koje izražavaju receptor CXCR4 s vrijednostima omjera albumina i kreatinina u urinu, upućujući na ulogu kompleksa CXCL12/CXCR4 u oštećenju bubrega i razvoju albuminurije već u dječjoj dobi, što je u skladu s ranijim rezultatima (172, 173). Uz navedeno, udjeli istih subpopulacija koje izražavaju receptor CXCR4 u djece sa šećernom bolešću su snažno, statistički značajno negativno korelirali s čimbenicima upale, sugerirajući povezanost kompleksa CXCL12/CXCR4 s upalnim procesom u toj skupini bolesnika, no i već ranije dokazanu povezanost upalnog okoliša s razvojem albuminurije.

Uloga kemokina CXCL10 i njegovog receptora CXCR3 dobro je istražena u modelima novootkrivene šećerne bolesti tipa 1. Opisana je uloga u začetku upalnog procesa u Langerhansovim otočićima, ali i u funkcionalnoj inhibiciji β -stanica u tijeku razvoja šećerne bolesti tipa 1, gdje β -stanice pod utjecajem citokina INF- γ izražavaju receptor CXCR3, a otpušteni kemokini privlače nove imunosne stanice (174, 175). Uočeno je da bi antagonisti kompleksa CXCL10/CXCR3 mogli imati potencijal u odgađanju razvoja klinički očite šećerne bolesti (66). S druge strane, uloga kompleksa CXCL10/CXCR3 u razvoju komplikacija šećerne bolesti i pretilosti tek se nazire. U pojedinim studijama koje su uključivale djecu i odrasle sa šećernom bolešću tipa 1 opisana je povišena koncentracija kemokina CXCL10 u bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu (66, 87). Istovremeno je uočeno kako je koncentracija toga

kemokina najviša u novootkrivenih bolesnika, potom se postupno smanjuje da bi se s duljim trajanjem šećerne bolesti ponovo povećala, no cijelo je vrijeme bila značajno viša nego u zdravih ispitanika (66, 87). Takav obrazac dinamike koncentracije kemokina CXCL10 mogao bi uputiti na povezanost toga kemokina s metaboličkim, odnosno vaskularnim komplikacijama šećerne bolesti. U odraslih osoba s teškim stupnjem pretilosti opisane su povišene koncentracije kemokina CXCL10 i CXCL11, koje su pritom pozitivno korelirale s opsegom struka, vrijednostima ITM te vrijednostima HOMA-IR (88). Ispitivano je i tkivno izražavanje spomenutih kemokina u pretilih odraslih osoba koje nemaju šećernu bolest, te je opisano pojačano otpuštanje kemokina CXCL10 i CXCL11 u masnom tkivu, kao i povezanost koncentracije kemokina CXCL11 iz masnog tkiva s upalnim i metaboličkim parametrima (koncentracija biljega CRP, serumska koncentracija glukoze i vrijednost HOMA-IR) (89). Zapažena je i moguća povezanost koncentracija kemokina CXCL10 s napredovanjem ateroskleroze u pretilih osoba (86).

U naših ispitanika nije uočena statistički značajna razlika u koncentraciji kemokina CXCL10 među skupinama ispitanika, kao niti statistički značajna korelacija s promatranim metaboličkim i upalnim parametrima. Koncentracija kemokina CXCL11 u djece sa šećernom bolešću također se nije statistički značajno razlikovala od kontrole, dok je koncentracija toga kemokina statistički značajno pozitivno korelirala s dozom inzulina. Za razliku od naših rezultata, Powell i suradnici su u svojem istraživanju opisali povišenu koncentraciju kemokina CXCL11 u odraslih osoba sa šećernom bolešću tipa 1 (87). Oba spomenuta kemokina, CXCL10 i CXCL11 mogu se vezati na receptor CXCR3. Taj je receptor u našem istraživanju izražen na manjem udjelu limfocita B u djece sa šećernom bolešću u odnosu na kontrolu, što je u skladu s ranije opisanim smanjenim udjelom limfocita T i limfocita B koji izražavaju receptor CXCR3 u mladim odraslih s dugotrajnom šećernom bolešću tipa 1 (87, 155). Rezultati nedavno objavljene studija Reijma i suradnika upućuju na moguću autoreaktivnu ulogu aktiviranih limfocita B koji izražavaju receptor CXCR3, važnu u patogenezi artritisa, ali i drugih autoimunskih bolesti (176). Istovremeno, u naših je ispitanika sa šećernom bolešću izražaj pripadajućeg receptora CXCR3 na monocitima statistički značajno negativno korelirao s vrijednostima HbA1c. Izražaj istog receptora na limfocitima B statistički je značajno negativno koreliralo s koncentracijom jetrenih enzima te pozitivno s koncentracijom triglicerida i vrijednostima krvnoga tlaka. Udio limfocita T koji izražavaju receptor CXCR3 statistički je značajno negativno korelirao s koncentracijom ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola, dok je izražaj receptora CXCR3 na više subpopulacija mononukleara statistički značajno negativno korelirao s parametrima upale. Takvi bi rezultati, po svemu, mogli uputiti na povezanost

kompleksa CXCL10/CXCR3 i CXCL11/CXCR3 s metaboličkim i upalnim procesima u djece sa šećernom bolešću.

U naših je pretilih ispitanika s izraženijim stupnjem pretilosti (vrijednostima ITM-SDS > 2 SD) uočena statistički značajno niža plazmatska koncentracija kemokina CXCL11 u odnosu na zdrave ispitanike te je istovremeno koncentracija kemokina CXCL11 statistički značajno pozitivno korelirala s čimbenicima upale, podupirući ulogu toga kemokina u patofiziologija promjena povezanih s upalnim stanjem u pretilih osoba već u dječjoj dobi. Istovremeno, u skupini pretila djece uočena je statistički značajna negativna korelacija udjela limfocita T koji izražavaju receptor CXCR3 s koncentracijom HDL-kolesterola, upućujući na ulogu kompleksa CXCL11/CXCR3 u metaboličkim i upalnim procesima i u ovoj skupini djece. Pretežito negativne korelacije izražaja receptora CXCR3 na subpopulacijama mononuklearnih stanica s metaboličkim i upalnim parametrima u naših ispitanika mogle bi biti u skladu s ranije prepoznatom ulogom receptora CXCR3 u privlačenju limfocita T u upalom zahvaćena tkiva, primjerice visceralno masno tkivo (177). Istovremeno, zbog uloge sekvestriranja liganda nakon vezanja na receptor, manji udio stanica koje nose receptor CXCR3 može dovesti do povećane bioraspoloživosti odgovarajućih kemokina (87).

Kemokini koji ponajviše privlače monocite, CCL2 i CCL5 vežu se prije svega na monocite koji izražavaju receptor CCR2, odnosno receptor CCR4, ali i na malu subpopulaciju limfocita T i limfocita B koji izražavaju spomenute receptore. Brojni radovi opisuju ulogu kemokina CCL2 u razvoju šećerne bolesti i njezinih komplikacija (66, 173, 178), kao i ključnu ulogu toga kemokina u pokretanju upalnog procesa regrutiranjem upalnih stanica uz povišene koncentracije kemokina CCL2 u pretilih osoba, uključujući djecu (77, 168, 179). U skladu s navedenim nalazima, uočili smo statistički značajno povišenu koncentraciju toga kemokina u djece s lošije reguliranom šećernom bolešću, s udjelom HbA1c većim od 8%. Istovremeno, uočena je i snažna, statistički značajna pozitivna korelacija kemokina CCL2 s udjelom HbA1c u svih ispitanika sa šećernom bolešću. Međutim, uspoređujući sve naše ispitanike sa šećernom bolešću sa zdravim ispitanicima nismo uočili značajne razlike u koncentraciji kemokina CCL2, što je u skladu s ranijim studijama (66, 178, 180). Jamali i suradnici uočili su povišenu koncentraciju kemokina CCL2 tek u skupini mladih osoba sa šećernom bolešću tipa 1 (<30 godina), koji su imali komplikacije bolesti (178). Ispitivanjem izražavanja komplementarnog receptora uočili smo značajno manji udio monocita koji su izražavali receptor CCR2 u skupini djece sa šećernom bolešću, što može biti posljedica novačenja tako aktiviranih stanica u upalom zahvaćena tkiva. Uz navedeno, u naših je ispitanika sa šećernom bolešću uočena i snažna, statistički značajna negativna korelacija gotovo svih promatranih subpopulacija

mononuklearnih stanica koje su izražavale receptor CCR2 s vrijednostima omjera albumina i kreatinina u urinu te upalnim parametrima. Takvi nalazi u skladu su s ranije opisanom ulogom kompleksa CCL2/CCR2 u razvoju dijabetičke nefropatije, zbog čega su Chang i suradnici predložili kemokin CCL2 kao biomarker rizika za razvoj dijabetičke nefropatije (173).

S druge strane, nije uočena statistički značajna razlika u koncentraciji kemokina CCL2 u skupini pretila djece u odnosu na zdrave ispitanike, iako je koncentracija kemokina CCL2 statistički značajno pozitivno korelirala s koncentracijama metaboličkih kardiorizičnih čimbenika, uz statistički značajnu pozitivnu korelaciju s koncentracijom enzima ALT. Ranije su Samaan i suradnici zabilježili povišene koncentracije kemokina CCL2 u pretila djece te opisali pozitivnu korelaciju koncentracije CCL2 s vrijednostima ITM, biljega CRP i udjelom masnog tkiva te negativnu korelaciju s koncentracijom HDL-kolesterola (179). Luciardi i suradnici opisali su i pozitivnu korelaciju koncentracije toga kemokina s vrijednostima ITM i opsegom struka (168). Još je jedna studija nedavno provela komparativnu analizu koncentracije kemokina CCL2 u djece sa šećernom bolešću tipa 1 i u pretila djece te je i u tih bolesnika opisana pozitivna korelacija koncentracije CCL2 s vrijednostima ITM-SDS. Iako naši rezultati nisu poduprli te nalaze, izražavanje odgovarajućeg receptor CCR2 na monocitima pokazalo je statistički značajnu pozitivnu korelaciju s vrijednostima ITM u pretila djece (181).

Uz kemokin CCL2, i kemokin CCL5 se našao u izvješćima o mogućoj povezanosti kemokina s komplikacijama šećerne bolesti, prije svega s razvojem dijabetičke nefropatije. U mladih sa šećernom bolešću tipa 1, opisana je statistički značajno povišena koncentracija toga kemokina u odnosu na njihove zdrave vršnjake, bez obzira na postojanje komplikacija bolesti (173, 178). U istraživanju pretilosti uočen je moguć doprinos kemokina CCL5 samom razvoju pretilosti i to djelujući na centralnu kontrolu prometa energije, odnosno modulirajući unos hrane i tjelesnu temperaturu putem hipotalamičkih centara (65, 78). Istovremeno je uočena i povezanost s poremećajem lipidnog metabolizma kao i s metabolizmom glukoze ovisnom o inzulinu (65). Dok kemokin CCL2 ima ulogu u započinjanju upalnog procesa novačenjem upalnih stanica u masno tkivo, čini se da kemokin CCL5 ima ulogu u održavanju toga stanja (78, 182).

Suprotno očekivanjima proizašlim iz spomenutih izvješća, u naših ispitanika koncentracije kemokina CCL5 nisu se statistički značajno razlikovale među skupinama, niti su u skupinama bolesnika pokazale statistički značajne korelacije s ispitivanim antropometrijskim i metaboličkim parametrima. Ipak, statistički značajna pozitivna korelacija koncentracije

kemokina CCL5 utvrđena je s koncentracijom biljega CRP u pretilo djece, upućujući na moguću aktivnu ulogu u kroničnom upalnom procesu povezanom s pretilošću.

Populacija limfocita T koja izražava receptor CCR4 najveća je djece sa šećernom bolešću. Naime, udio limfocita T koji su izražavali receptor CCR4 bio je statistički značajno veći u djece sa šećernom bolešću u odnosu na istu subpopulaciju u zdravih ispitanika. Nekoliko se kemokina može vezati na receptor CCR4, uključujući selektivne agoniste CCL17 i CCL22 koje nismo istraživali u našoj studiji (183, 184). No pokazano je da se u upalnim stanjima i kemokini CCL2, CCL3 i CCL5 također pojačano vežu na receptor CCR4, što smo pretpostavili da je relevantno za naše istraživanje. Receptor CCR4 izražen na efektorskim pomagačkim limfocitima Th2, za razliku od receptora CXCR3 koji je izražen na limfocitima Th1, te ima dokazanu ulogu u nekim upalnim bolestima i bolestima preosjetljivosti (184).

Sve analizirane subpopulacije mononuklearnih stanica periferne krvi koje su izražavale receptor CCR4, statistički su značajno pozitivno korelirale s trajanjem šećerne bolesti u skupini ispitanika sa šećernom bolešću, upućujući na moguću povezanost aktivnosti toga receptora s napredovanjem bolesti, odnosno metaboličkim i upalnim poremećajima koji se događaju s razvojem i trajanjem šećerne bolesti. U pretilih bolesnika, promatrane subpopulacije mononuklearnih stanica koje su izražavale receptor CCR4 statistički su značajno negativno korelirale s omjerom albumina i kreatinina u urinu (vrijednost ACR), što je bilo najizraženije za subpopulaciju monocita, dok je udio limfocita T s istim receptorom statistički značajno negativno korelirao s koncentracijom glukoze u krvi, no pozitivno s vrijednošću sistoličkog krvnog tlaka. Takvi rezultati, u skladu su s ranijim izvješćima i upućuju na moguću povezanost kompleksa CCL5/CCR4 s mikrovaskularnim, prije svega bubrežnim oštećenjem te pretpostavljaju mogući učinak, putem aktivacije receptora CCR4, na vrijednosti krvnog tlaka u osoba s pretilošću, počevši već od dječje dobi (173).

6.4. Ograničenja studije i mogući značaj za dizajniranje terapijskih intervencija

Prema našim saznanjima, ovo je prva studija koja je komparativnom analizom istraživala profil kemokinske mreže u djece sa šećernom bolešću tipa 1 i u pretilo djece. Iako su rezultati znatno proširili postojeće spoznaje o ulozi kemokinskih signala u šećernoj bolesti i pretilosti djece i adolescenata, svjesni smo određenih ograničenja koja nosi dizajn naše studije.

Kako je cilj bio procijeniti parametre kronične upale i kardiometaboličke rizike u djece sa šećernom bolešću duljeg trajanja (medijan trajanja bolesti je 10 godina), iz istraživanja su izostavljeni novootkriveni bolesnici. Uz to, s obzirom da se radi o dječjoj populaciji naši ispitanici nisu još pogođeni značajnijim komplikacijama šećerne bolesti. Na taj su način izostavljene skupine bolesnika s potencijalno većim intenzitetom upale, pa time i s izraženijim odstupanjima u vrijednostima metaboličkih i upalnih parametara. Stoga su potrebne i dodatne studije koje bi analizirale lokalnu i sistemnu aktivnost kemokina u različitim stadijima bolesti. Osim navedenog, određivanje izražaja kemokinskih receptora dalo je velik raspon rezultata, što je uz relativno malobrojne skupine ispitanika rezultiralo izostankom značajnih razlika. Konačno, zbog presječnog dizajna naše studije nismo bili u mogućnosti utvrditi uzročnu povezanost kemokinske mreže s kardiometaboličkim čimbenicima rizika, jer isto zahtijeva praćenje bolesnika. Ipak, vjerujemo da su naši rezultati istaknuli moguće kandidate za dodatne funkcionalne i prospektivne studije te razvoj budućih terapijskih intervencija.

U konačnici možemo zaključiti da naši rezultati potvrđuju ranije nalaze koji govore u prilog postojanju kontinuiranog, blagog upalnog stanja u osoba sa šećernom bolešću tipa 1 te u pretilih osoba, i to već od dječje dobi. Pokazali smo moguću povezanost mreže kemokina i kemokinskih receptora s upalnim parametrima, kardiometaboličkim čimbenicima rizika te mogućim prvim znacima tkivnog oštećenja. Kako se navedeni odnosi razlikuju u pojedinoj bolesti, možemo reći da su neke promjene specifične za bolest i da upalno stanje po svemu podliježe različitim regulatornim procesima u šećernoj bolesti, odnosno pretilosti. Ipak, prisutna su i djelomična, no važna preklapanja u povezanosti kemokinske mreže i metaboličnih, odnosno vaskularnih komplikacija u oba promatrana stanja: primjerice povezanost kompleksa CXCR4/CXCL12 s albuminurijom, povezanost kompleksa CXCR3/CXCL11 s metaboličnim i upalnim čimbenicima te povezanost limfocita T koji izražavaju receptor CCR4 s krvnim tlakom, što upućuje na zaključak o povezanosti upale s endotelnom disfunkcijom, metaboličkom disregulacijom te integritetom i funkcijom krvožilne stijenke.

Preklapajući obrasci povezanosti kemokinske mreže s kardiometaboličkim čimbenicima rizika u oba stanja mogu uputiti na potencijalne kandidate za zajedničke terapijske intervencije, koje bi vrijedilo dalje istražiti. U tom smislu izdvojili su se receptori CCR4, CXCR3 i CXCR4, čije bi blokiranje imalo svrhu smanjenja kardiometaboličkih rizika i odgađanja vaskularnih komplikacija šećerne bolesti i pretilosti. Antagonist receptora CXCR4 (Plerixafor) i monoklonsko protutijelo anti-CCR4 (Mogamulizumab) već su odobreni za liječenje određenih malignih oboljenja (185-187). Uz to, u kliničkim studijama ispituje se moguća uloga inhibitora receptora CXCR3 u liječenju upalnih i autoimunskih bolesti, a

ohrabrujući rezultati govore u prilog odgađanja progresije šećerne bolesti tipa 1 prema klinički očitij bolesti uz primjenu inhibitora (66, 188).

7. ZAKLJUČCI

Ovim istraživanjem analizirali smo pojavnost kardiometaboličkih čimbenika rizika te pokazatelja upale u djece sa šećernom bolešću tipa 1 i u pretilo djece te potom detaljnije analizirali upalno okruženje u oba navedena stanja. U tom smislu analizirali smo zastupljenost imunosnih populacija mononuklearnih stanica periferne krvi, izražavanje odabranih kemokina i kemokinskih receptora te, konačno, povezanost kemokinske mreže s kardiometaboličkim čimbenicima rizika te smo došli do sljedećih zaključaka:

1. U djece sa šećernom bolešću tipa 1, a posebice u pretilo djece uočena je značajna zastupljenost kardiometaboličkih čimbenika rizika u odnosu na zdrave ispitanike.
2. Značajan je udio pretilih imao barem jedan dodatni kardiometabolički čimbenik rizika (dislipidemija u preko 60%, povišeni krvni tak u gotovo 50% te inzulinska rezistencija u gotovo 80% djece).
3. Djeca sa šećernom bolešću tipa 1 imala su izraženu dislipidemiju sa značajno višom koncentracijom ukupnog kolesterola, LDL-kolesterola i triglicerida, pri čemu je udio djece s hiperkolesterolemijom dosegao preko 50%.
4. U pretilo djece statistički značajno su povišene koncentracije upalnih parametara CRP i fibrinogena, dok je u djece sa šećernom bolešću uočena povišena koncentracija biljega CRP u odnosu na zdrave ispitanike.
5. Upalni parametri statistički značajno su korelirali s kardiometaboličkim čimbenicima rizika, pa su vrijednosti biljega CRP pozitivno korelirale s koncentracijama LDL-kolesterola, triglicerida, enzima ALT te vrijednostima HOMA-IR i negativno s koncentracijom HDL-kolesterola, a vrijednosti fibrinogena su uz navedeno bile pozitivno povezane i s omjerom ACR, dijastoličkim krvnim tlakom i vrijednostima ITM-SDS.
6. Analizom subpopulacija mononuklearnih stanica periferne krvi uočen je statistički značajno povećan udio monocita ($CD14^{+}$) u djece sa šećernom bolešću, dok su u pretilo djece u većem udjelu bili zastupljeni limfociti B ($CD19^{+}$), a značajno manjem limfociti T ($CD3^{+}$).
7. Koncentracije kemokina CCL2 statistički značajno su više u dijabetične djece s lošom kontrolom glikemije, kemokina CXCL11 su statistički značajno niže u djece s težim stupnjem pretilosti. Koncentracija kemokina CXCL12 statistički su značajno niže u obje ispitivane skupine bolesnika u odnosu na kontrolu.

8. Od korelacija s parametrima koji opisuju značajke šećerne bolesti u naših ispitanika, sve subpopulacije mononuklearnih stanica koje su izražavale receptor CCR4⁺ statistički su značajno pozitivno korelirale s trajanjem šećerne bolesti upućujući na ulogu u održavanju kroničnog upalnog stanja, a koncentracije kemokina CCL2 pozitivno su povezane s udjelom HbA1c povezujuću upalu s kontrolom glikemije.
9. Najvažniji indikatori kardiom metaboličkog rizika u djece sa šećernom bolešću su: statistički značajna pozitivna povezanost monocita CCR2⁺ s krvnim tlakom, limfocita B CCR2⁺ i CXCR3⁺ s koncentracijom triglicerida i koncentracije kemokina CCL12 s omjerom ACR te statistički značajna negativna povezanost više subpopulacija stanica CCR2⁺ s omjerom ACR i parametrima upale.
10. Od korelacija sa značajkama stupnja bolesti u pretilo djece, udio monocita CCR2⁺ pozitivno je korelirao s vrijednostima ITM-SDS, dok je udio monocita CXCR4⁺ negativno korelirao s vrijednostima HOMA-IR, uz istovremeno pozitivnu korelaciju koncentracije kemokina CXCL12 s koncentracijom glukoze u krvi.
11. Najvažniji indikatori kardiom metaboličkog rizika u djece s pretilošću, uz gore navedeno, su: statistički značajna pozitivna povezanost koncentracije kemokina CCL5 i CXCL11 s koncentracijom biljega CRP i koncentracije CXCL12 s koncentracijom triglicerida i jetrenih enzima te statistički značajna negativna povezanost udjela monocita CCR4⁺ i CXCR3⁺ s omjerom ACR.
12. Iako su utvrđene brojne povezanosti specifične za bolest, preklapajući obrazac u šećernoj bolesti i pretilosti utvrđen je za pozitivnu povezanost limfocita T CCR4⁺ i krvnog tlaka, negativnu povezanost subpopulacija CXCR4⁺ s omjerom ACR i negativnu povezanost limfocita T CXCR3⁺ i lipidnog profila.
13. Zajedničke promjene u šećernoj bolesti tipa 1 i pretilosti upućuju na povezanost limfocita T CCR4⁺ i disfunkcije krvožilne stijenke, subpopulacija CXCR4⁺ i albuminurije te limfocita T CXCR3⁺ i dislipidemije, što može uputiti na moguće zajedničke terapijske ciljeve.

8. SAŽETAK

U djece sa šećernom bolešću tipa 1 i pretilošću, dobi 12 do 18 godina, analizirali smo profil kemokina i kemokinskih receptora u perifernoj krvi s ciljem usporedbe sa zdravim ispitanicima te utvrđivanja povezanosti s kardiometaboličkim čimbenicima rizika. Koncentracija kemokina CCL2 povišena je u djece s loše reguliranim šećernom bolešću, kemokina CXCL11 snižena je u značajno pretilih, dok je kemokina CXCL12 snižena u obje skupine bolesnika. Uočene su brojne značajne korelacije kemokina i kemokinskih receptora s kardiometaboličkim i upalnim parametrima. U šećernoj bolesti se izdvaja pozitivna korelacija monocita CCR2⁺ s krvnim tlakom, limfocita B CCR2⁺ i CXCR3⁺ s trigliceridima, kemokina CCL2 s udjelom HbA1c i kemokina CXCL12 s omjernom albumina i kreatinina u urinu (ACR), uz negativnu povezanost subpopulacija CCR2⁺ s ACR. U pretilih dominira pozitivna povezanost kemokina CXCL12 s više metaboličkih parametara, negativna povezanost monocita CCR4⁺ i CXCR3⁺ s omjerom ACR te monocita s vrijednostima HOMA-IR. U obje bolesti nalazimo negativnu povezanost subpopulacija CXCR4⁺ s omjerom ACR i limfocita T CXCR3⁺ s lipidogramom te pozitivnu povezanost limfocita T CCR4⁺ s krvnim tlakom. Iako različiti rezultati sugeriraju imunoregulaciju specifičnu za pojedinu bolest, između šećerne bolesti i pretilosti postoje i preklapajući obrasci koji povezuju kemokinske signale s metaboličkom i vaskularnom disfunkcijom te predstavljaju moguće zajedničke terapijske ciljeve.

9. SUMMARY

Association of plasma levels of chemokines with metabolic complications of type 1 diabetes and obesity in children

Anita Špehar Uroić

2025

We compared peripheral blood chemokine/receptor profiles in children and adolescents (12-18 years) with type 1 diabetes mellitus (T1D) or obesity to healthy controls and analyzed associations of chemokine network with cardiometabolic risk factors. The level of CCL2 was higher in poorly controlled T1D, CXCL11 was lower in severe obesity and CXCL12 was lower in both diseases. Numerous significant associations were found for chemokine/receptor profiles and cardiometabolic/inflammatory parameters. In T1D we can emphasize positive associations of CCR2⁺ monocytes with blood pressure, CCR2⁺ and CXCR3⁺ B lymphocytes with triglycerides, CCL2 levels with HbA1c and CXCL12 levels with urine albumin-to-creatinine ratio (ACR), and inverse association of CCR2⁺ subsets with ACR. Major findings in obesity are positive associations of CXCL12 with metabolic parameters, inverse association of CCR4⁺ and CXCR3⁺ monocytes with ACR, and CXCR4⁺ monocytes with HOMA-IR. Both diseases share inverse associations of CXCR4⁺ subsets with ACR and CXCR3⁺ T lymphocytes with lipid profile, and positive associations of CCR4⁺ T lymphocytes with blood pressure. Although different results indicate disease-specific immunoregulation, overlapping patterns found in T1D and obesity suggest shared associations of chemokine axes with metabolic and vascular dysfunction. Thus, chemokine axes might present potential common therapeutic targets for disease-related morbidity.

10. LITERATURA

1. Schram MT, Chaturvedi N, Schalkwijk CG, Fuller JH, Stehouwer CD, Group EPCS. Markers of inflammation are cross-sectionally associated with microvascular complications and cardiovascular disease in type 1 diabetes--the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia*. 2005;48(2):370-8. doi: 10.1007/s00125-004-1628-8 .
2. Liu R, Nikolajczyk BS. Tissue Immune Cells Fuel Obesity-Associated Inflammation in Adipose Tissue and Beyond. *Front Immunol*. 2019;10:1587. doi: 10.3389/fimmu.2019.01587
3. Patterson CC, Karuranga S, Salpea P, Saeedi P, Dahlquist G, Soltesz G, i sur. Worldwide estimates of incidence, prevalence and mortality of type 1 diabetes in children and adolescents: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract*. 2019;157:107842. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107842
4. Kumar S, Kelly AS. Review of Childhood Obesity: From Epidemiology, Etiology, and Comorbidities to Clinical Assessment and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2017;92(2):251-65. doi: 10.1016/j.mayocp.2016.09.017
5. Garrido-Miguel M, Cavero-Redondo I, Alvarez-Bueno C, Rodriguez-Artalejo F, Moreno LA, Ruiz JR, i sur. Prevalence and Trends of Overweight and Obesity in European Children From 1999 to 2016: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Pediatr*. 2019;173(10):e192430. doi: 10.1001/jamapediatrics.2019.2430
6. Music Milanovic S, Lang Morovic M, Bukal D, Krizan H, Buoncristiano M, Breda J. Regional and sociodemographic determinants of the prevalence of overweight and obesity in children aged 7-9 years in Croatia. *Acta Clin Croat*. 2020;59(2):303-11. doi: 10.20471/acc.2020.59.02.14
7. Patterson CC, Harjutsalo V, Rosenbauer J, Neu A, Cinek O, Skrivarhaug T, i sur. Trends and cyclical variation in the incidence of childhood type 1 diabetes in 26 European centres in the 25 year period 1989-2013: a multicentre prospective registration study. *Diabetologia*. 2019;62(3):408-17. doi: 10.1007/s00125-018-4763-3
8. Rojnic Putarek N, Ille J, Spehar Uroic A, Skrabic V, Stipancic G, Krnic N, i sur. Incidence of type 1 diabetes mellitus in 0 to 14-yr-old children in Croatia--2004 to 2012 study. *Pediatr Diabetes*. 2015;16(6):448-53. doi: 10.1111/pedi.12197
9. Nathan DM, Group DER. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview. *Diabetes Care*. 2014;37(1):9-16. doi: 10.2337/dc13-2112

10. Ruiz PLD, Chen L, Morton JI, Salim A, Carstensen B, Gregg EW, i sur. Mortality trends in type 1 diabetes: a multicountry analysis of six population-based cohorts. *Diabetologia*. 2022;65(6):964-72. doi: 10.1007/s00125-022-05659-9
11. Giannini C, Mohn A, Chiarelli F, Kelnar CJ. Macrovascular angiopathy in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2011;27(5):436-60. doi: 10.1002/dmrr.1195
12. de Bock M, Codner E, Craig ME, Huynh T, Maahs DM, Mahmud FH, i sur. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2022: Glycemic targets and glucose monitoring for children, adolescents, and young people with diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2022;23(8):1270-6. doi: 10.1111/vedi.13455
13. American Diabetes Association Professional Practice C, Draznin B, Aroda VR, Bakris G, Benson G, Brown FM, i sur. 14. Children and Adolescents: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care*. 2022;45(Suppl 1):S208-S31. doi: 10.2337/dc22-S014
14. Maahs DM, Daniels SR, de Ferranti SD, Dichek HL, Flynn J, Goldstein BI, i sur. Cardiovascular disease risk factors in youth with diabetes mellitus: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;130(17):1532-58. doi: 10.1161/CIR.0000000000000094
15. Kavey RE, Allada V, Daniels SR, Hayman LL, McCrindle BW, Newburger JW, i sur. Cardiovascular risk reduction in high-risk pediatric patients: a scientific statement from the American Heart Association Expert Panel on Population and Prevention Science; the Councils on Cardiovascular Disease in the Young, Epidemiology and Prevention, Nutrition, Physical Activity and Metabolism, High Blood Pressure Research, Cardiovascular Nursing, and the Kidney in Heart Disease; and the Interdisciplinary Working Group on Quality of Care and Outcomes Research: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation*. 2006;114(24):2710-38. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.179568
16. Stevanović R, Capak K, Benjak T, ur Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2016. godinu. Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2017. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2018/05/Ljetopis_2016_IX.pdf
17. Stevanović R, Capak K, Benjak T, ur Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2019. godinu. Zagreb, Hrvatska: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2020. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2021/02/Ljetopis_Yerabook_2019.pdf
18. Stevanović R, Capak K, Benjak T, ur. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2022. godinu: Zagreb, Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2023. Dostupno na: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2024/05/HZSLj_2022_12-2023.pdf

19. Ells LJ, Rees K, Brown T, Mead E, Al-Khudairy L, Azevedo L, i sur. Interventions for treating children and adolescents with overweight and obesity: an overview of Cochrane reviews. *Int J Obes (Lond)*. 2018;42(11):1823-33. doi: 10.1038/s41366-018-0230-y
20. Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, Seidel KD, Dietz WH. Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N Engl J Med*. 1997;337(13):869-73. doi: 10.1056/NEJM199709253371301
21. Paulis WD, Silva S, Koes BW, van Middelkoop M. Overweight and obesity are associated with musculoskeletal complaints as early as childhood: a systematic review. *Obes Rev*. 2014;15(1):52-67. doi: 10.1111/obr.12067
22. Egan KB, Ettinger AS, Bracken MB. Childhood body mass index and subsequent physician-diagnosed asthma: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *BMC Pediatr*. 2013;13:121. doi: 10.1186/1471-2431-13-121
23. Bendor CD, Bardugo A, Pinhas-Hamiel O, Afek A, Twig G. Cardiovascular morbidity, diabetes and cancer risk among children and adolescents with severe obesity. *Cardiovasc Diabetol*. 2020;19(1):79. doi: 10.1186/s12933-020-01052-1
24. Griffiths LJ, Parsons TJ, Hill AJ. Self-esteem and quality of life in obese children and adolescents: a systematic review. *Int J Pediatr Obes*. 2010;5(4):282-304. doi: 10.3109/17477160903473697
25. Valle Jimenez M, Estepa RM, Camacho RM, Estrada RC, Luna FG, Guitarte FB. Endothelial dysfunction is related to insulin resistance and inflammatory biomarker levels in obese prepubertal children. *Eur J Endocrinol*. 2007;156(4):497-502. doi: 10.1530/EJE-06-0662
26. Bruyndonckx L, Hoymans VY, Van Craenenbroeck AH, Vissers DK, Vrints CJ, Ramet J, i sur. Assessment of endothelial dysfunction in childhood obesity and clinical use. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:174782. doi: 10.1155/2013/174782
27. Montero D, Walther G, Perez-Martin A, Roche E, Vinet A. Endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in obese children and adolescents: markers and effect of lifestyle intervention. *Obes Rev*. 2012;13(5):441-55. doi: 10.1111/j.1467-789X.2011.00956.x
28. Kapiotis S, Holzer G, Schaller G, Haumer M, Widhalm H, Weghuber D, i sur. A proinflammatory state is detectable in obese children and is accompanied by functional and morphological vascular changes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(11):2541-6. doi: 10.1161/01.ATV.0000245795.08139.70
29. Roh EJ, Lim JW, Ko KO, Cheon EJ. A useful predictor of early atherosclerosis in obese children: serum high-sensitivity C-reactive protein. *J Korean Med Sci*. 2007;22(2):192-7. doi: 10.3346/jkms.2007.22.2.192

30. Jensen ET, Dabelea D. Type 2 Diabetes in Youth: New Lessons from the SEARCH Study. *Curr Diab Rep.* 2018;18(6):36. doi: 10.1007/s11892-018-0997-1
31. Breyer MK, Ofenheimer A, Altziebler J, Hartl S, Burghuber OC, Studnicka M, i sur. Marked differences in prediabetes- and diabetes-associated comorbidities between men and women-Epidemiological results from a general population-based cohort aged 6-80 years-The LEAD (Lung, hEart, sociAl, boDy) study. *Eur J Clin Invest.* 2020;50(3):e13207.doi: 10.1111/eci.13207
32. Kim G, Divers J, Fino NF, Dabelea D, Lawrence JM, Reynolds K, i sur. Trends in prevalence of cardiovascular risk factors from 2002 to 2012 among youth early in the course of type 1 and type 2 diabetes. The SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Pediatr Diabetes.* 2019;20(6):693-701.doi: 10.1111/pedi.12846
33. Pastore I, Bolla AM, Montefusco L, Lunati ME, Rossi A, Assi E, i sur. The Impact of Diabetes Mellitus on Cardiovascular Risk Onset in Children and Adolescents. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14). doi: 10.3390/ijms21144928
34. Dabelea D, Stafford JM, Mayer-Davis EJ, D'Agostino R, Jr., Dolan L, Imperatore G, i sur. Association of Type 1 Diabetes vs Type 2 Diabetes Diagnosed During Childhood and Adolescence With Complications During Teenage Years and Young Adulthood. *JAMA.* 2017;317(8):825-35. doi: doi: 10.1001/jama.2017.0686
35. Noras K, Rusak E, Jarosz-Chobot P. The Problem of Abnormal Body Weight and Dyslipidemia as Risk Factors for Cardiovascular Diseases in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes. *J Diabetes Res.* 2021;2021:5555149. doi: 10.1155/2021/5555149
36. Diabetes Control and Complications Trial /Epidemiology of Diabetes I, Complications Study Research G. Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Outcomes in Type 1 Diabetes: The DCCT/EDIC Study 30-Year Follow-up. *Diabetes Care.* 2016;39(5):686-93. doi: 10.2337/dc15-1990
37. Gorst C, Kwok CS, Aslam S, Buchan I, Kontopantelis E, Myint PK, i sur. Long-term Glycemic Variability and Risk of Adverse Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care.* 2015;38(12):2354-69. doi: 10.2337/dc15-1188
38. Foreman YD, van Doorn W, Schaper NC, van Greevenbroek MMJ, van der Kallen CJH, Henry RMA, i sur. Greater daily glucose variability and lower time in range assessed with continuous glucose monitoring are associated with greater aortic stiffness: The Maastricht Study. *Diabetologia.* 2021;64(8):1880-92. doi: 10.1007/s00125-021-05474-8

39. McGill HC, Jr., McMahan CA, Herderick EE, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(5 Suppl):1307S-15S. doi: 10.1093/ajcn/72.5.1307s
40. Blake GJ, Ridker PM. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med.* 2002;252(4):283-94. doi: 10.1046/j.1365-2796.2002.01019.x
41. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420(6917):868-74. doi: 10.1038/nature01323
42. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP, 3rd, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med.* 1998;338(23):1650-6. doi: 10.1056/NEJM199806043382302
43. Dalla Pozza R, Bechtold S, Bonfig W, Putzker S, Kozlik-Feldmann R, Netz H, i sur. Age of onset of type 1 diabetes in children and carotid intima medial thickness. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(6):2053-7. doi: 10.1210/jc.2006-2868
44. Jarvisalo MJ, Putto-Laurila A, Jartti L, Lehtimäki T, Solakivi T, Ronnema T, i sur. Carotid artery intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2002;51(2):493-8. doi: 10.2337/diabetes.51.2.493
45. de Groot E, Hovingh GK, Wiegman A, Duriez P, Smit AJ, Fruchart JC, i sur. Measurement of arterial wall thickness as a surrogate marker for atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109(23 Suppl 1):III33-8. doi: 10.1161/01.CIR.0000131516.65699.ba
46. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, i sur. Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004-2006). An update on behalf of the Advisory Board of the 3rd and 4th Watching the Risk Symposium, 13th and 15th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, and Brussels, Belgium, 2006. *Cerebrovasc Dis.* 2007;23(1):75-80. doi: 10.1159/000097034
47. Stabouli S, Kotsis V, Papamichael C, Constantopoulos A, Zakopoulos N. Adolescent obesity is associated with high ambulatory blood pressure and increased carotid intimal-medial thickness. *J Pediatr.* 2005;147(5):651-6. doi: 10.1016/j.jpeds.2005.06.008
48. Kusters DM, Wiegman A, Kastelein JJ, Hutten BA. Carotid intima-media thickness in children with familial hypercholesterolemia. *Circ Res.* 2014;114(2):307-10. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.301430
49. Putarek K, Banfić L, Pasalić M, Krnić N, Špehar Uroić A, Rojnić Putarek N. Arterial stiffness as a measure of cardiovascular risk in obese adolescents and adolescents with diabetes type 1. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2018;31(12):1315-23. doi: 10.1515/jpem-2018-0137

50. Taya N, Katakami N, Mita T, Okada Y, Wakasugi S, Yoshii H, i sur. Associations of continuous glucose monitoring-assessed glucose variability with intima-media thickness and ultrasonic tissue characteristics of the carotid arteries: a cross-sectional analysis in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2021;20(1):95. doi: 10.1186/s12933-021-01288-5
51. Cutruzzola A, Parise M, Scavelli FB, Barone M, Gnasso A, Irace C. Time in Range Does Not Associate With Carotid Artery Wall Thickness and Endothelial Function in Type 1 Diabetes. *J Diabetes Sci Technol.* 2022;16(4):904-11. doi: 10.1177/1932296821993178
52. Wu H, Ballantyne CM. Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Circ Res.* 2020;126(11):1549-64. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315896
53. Nadeau KJ, Maahs DM, Daniels SR, Eckel RH. Childhood obesity and cardiovascular disease: links and prevention strategies. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8(9):513-25. doi: 10.1038/nrcardio.2011.86
54. Wang Z, Nakayama T. Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:535918. doi: 10.1155/2010/535918
55. Croce S, Avanzini MA, Regalbuto C, Cordaro E, Vinci F, Zuccotti G, i sur. Adipose Tissue Immunomodulation and Treg/Th17 Imbalance in the Impaired Glucose Metabolism of Children with Obesity. *Children (Basel).* 2021;8(7). doi: 10.3390/children8070554
56. Bjornstad P, Dart A, Donaghue KC, Dost A, Feldman EL, Tan GS, i sur. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2022: Microvascular and macrovascular complications in children and adolescents with diabetes. *Pediatr Diabetes.* 2022;23(8):1432-50. doi: 10.1111/pedi.13444
57. Stern DM, Yan SD, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. *Ageing Res Rev.* 2002;1(1):1-15. doi: 10.1016/s0047-6374(01)00366-9
58. Goh SY, Cooper ME. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1143-52.
59. Taguchi K, Fukami K. RAGE signaling regulates the progression of diabetic complications. *Front Pharmacol.* 2023;14:1128872. doi: 10.1210/jc.2007-1817
60. Kurianowicz K, Klatka M, Polak A, Hymos A, Bebnowska D, Podgajna M, i sur. Impaired Innate Immunity in Pediatric Patients Type 1 Diabetes-Focus on Toll-like Receptors Expression. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22). doi: 10.3390/ijms222212135
61. Pahwa R, Jialal I. Hyperglycemia Induces Toll-Like Receptor Activity Through Increased Oxidative Stress. *Metab Syndr Relat Disord.* 2016;14(5):239-41. doi: 10.1089/met.2016.29006.pah

62. Menini S, Iacobini C, Vitale M, Pugliese G. The Inflammasome in Chronic Complications of Diabetes and Related Metabolic Disorders. *Cells*. 2020;9(8).doi: 10.3390/cells9081812
63. Collier JJ, Sparer TE, Karlstad MD, Burke SJ. Pancreatic islet inflammation: an emerging role for chemokines. *J Mol Endocrinol*. 2017;59(1):R33-R46. doi: 10.1530/JME-17-0042
64. DeBoer MD. Obesity, systemic inflammation, and increased risk for cardiovascular disease and diabetes among adolescents: a need for screening tools to target interventions. *Nutrition*. 2013;29(2):379-86. doi: 10.1016/j.nut.2012.07.003
65. Chan PC, Hsieh PS. The Chemokine Systems at the Crossroads of Inflammation and Energy Metabolism in the Development of Obesity. *Int J Mol Sci*. 2021;22(24). doi: 10.3390/ijms222413528
66. Christen U, Kimmel R. Chemokines as Drivers of the Autoimmune Destruction in Type 1 Diabetes: Opportunity for Therapeutic Intervention in Consideration of an Optimal Treatment Schedule. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:591083. doi: 10.3389/fendo.2020.591083
67. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J*. 2018;285(16):2944-71. doi: 10.1111/febs.14466
68. Atkinson MA, Wilson SB. Fatal attraction: chemokines and type 1 diabetes. *J Clin Invest*. 2002;110(11):1611-3. doi: 10.1172/JCI17311
69. Raghuwanshi SK, Su Y, Singh V, Haynes K, Richmond A, Richardson RM. The chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 couple to distinct G protein-coupled receptor kinases to mediate and regulate leukocyte functions. *J Immunol*. 2012;189(6):2824-32. doi: 10.4049/jimmunol.1201114
70. Eiger DS, Boldizar N, Honeycutt CC, Gardner J, Rajagopal S. Biased agonism at chemokine receptors. *Cell Signal*. 2021;78:109862 doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109862.
71. Zweemer AJ, Toraskar J, Heitman LH, AP IJ. Bias in chemokine receptor signalling. *Trends Immunol*. 2014;35(6):243-52. doi: 10.1016/j.it.2014.02.004
72. Ridiandries A, Tan JT, Bursill CA. The Role of CC-Chemokines in the Regulation of Angiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(11). doi: 10.1016/j.it.2014.02.004
73. Ismail NA, Abd El Baky AN, Ragab S, Hamed M, Hashish MA, Shehata A. Monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage migration inhibitory factor in children with type 1 diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2016;29(6):641-5. doi: 10.1515/jpem-2015-0340

74. Kim SH, Cleary MM, Fox HS, Chantry D, Sarvetnick N. CCR4-bearing T cells participate in autoimmune diabetes. *J Clin Invest.* 2002;110(11):1675-86. doi: 10.1172/JCI15547
75. Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Ferrannini E, Fallahi P. CXCR3, CXCL10 and type 1 diabetes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25(1):57-65. doi: 10.1172/JCI15547
76. Sarkar SA, Lee CE, Victorino F, Nguyen TT, Walters JA, Burrack A, i sur. Expression and regulation of chemokines in murine and human type 1 diabetes. *Diabetes.* 2012;61(2):436-46. doi: 10.2337/db11-0853
77. Xu L, Kitade H, Ni Y, Ota T. Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Obesity-Associated Insulin Resistance and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Biomolecules.* 2015;5(3):1563-79. doi: 10.3390/biom5031563
78. Zhang Z, Wang Q, Yao J, Zhou X, Zhao J, Zhang X, i sur. Chemokine Receptor 5, a Double-Edged Sword in Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease. *Front Pharmacol.* 2020;11:146. doi: 10.3389/fphar.2020.00146
79. Li J, Ley K. Lymphocyte migration into atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(1):40-9. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303227
80. Chang TT, Chen JW. Emerging role of chemokine CC motif ligand 4 related mechanisms in diabetes mellitus and cardiovascular disease: friends or foes? *Cardiovasc Diabetol.* 2016;15(1):117. doi: 10.1186/s12933-016-0439-9
81. van der Vorst EP, Doring Y, Weber C. Chemokines and their receptors in Atherosclerosis. *J Mol Med (Berl).* 2015;93(9):963-71. doi: 10.1007/s00109-015-1317-8
82. Panee J. Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine.* 2012;60(1):1-12. doi: 10.1016/j.cyto.2012.06.018
83. Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C, Muros de Fuentes M, Garcia-Perez J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(6):327-40. doi: 10.1038/nrneph.2011.51
84. Barutta F, Bruno G, Grimaldi S, Gruden G. Inflammation in diabetic nephropathy: moving toward clinical biomarkers and targets for treatment. *Endocrine.* 2015;48(3):730-42. doi: 10.1007/s12020-014-0437-1
85. Vidakovic M, Grdovic N, Dinic S, Mihailovic M, Uskokovic A, Arambasic Jovanovic J. The Importance of the CXCL12/CXCR4 Axis in Therapeutic Approaches to Diabetes Mellitus Attenuation. *Front Immunol.* 2015;6:403. doi: 10.3389/fimmu.2015.00403

86. Yao L, Herlea-Pana O, Heuser-Baker J, Chen Y, Barlic-Dicen J. Roles of the chemokine system in development of obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. *J Immunol Res.* 2014;2014:181450. doi: 10.1155/2014/181450
87. Powell WE, Hanna SJ, Hocter CN, Robinson E, Davies J, Dunseath GJ, i sur. Loss of CXCR3 expression on memory B cells in individuals with long-standing type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2018;61(8):1794-803. doi: 10.1007/s00125-018-4651-x
88. Hueso L, Ortega R, Selles F, Wu-Xiong NY, Ortega J, Civera M, i sur. Upregulation of angiostatic chemokines IP-10/CXCL10 and I-TAC/CXCL11 in human obesity and their implication for adipose tissue angiogenesis. *Int J Obes (Lond).* 2018;42(8):1406-17. doi: 10.1038/s41366-018-0102-5
89. Kochumon S, Madhoun AA, Al-Rashed F, Azim R, Al-Ozairi E, Al-Mulla F, i sur. Adipose tissue gene expression of CXCL10 and CXCL11 modulates inflammatory markers in obesity: implications for metabolic inflammation and insulin resistance. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 2020;11:2042018820930902. doi: 10.1177/2042018820930902
90. Guan R, Purohit S, Wang H, Bode B, Reed JC, Steed RD, i sur. Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) in sera of patients with type 1 diabetes and diabetic complications. *PLoS One.* 2011;6(4):e17822. doi: 10.1371/journal.pone.0017822
91. Libman I, Haynes A, Lyons S, Pradeep P, Rwagasor E, Tung JY, i sur. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2022: Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes.* 2022;23(8):1160-74. doi: 10.1111/pedi.13454
92. Barlow SE, Expert C. Expert committee recommendations regarding the prevention, assessment, and treatment of child and adolescent overweight and obesity: summary report. *Pediatrics.* 2007;120 Suppl 4:S164-92. doi: 10.1542/peds.2007-2329C
93. Joisten C, Wessely S, Prinz N, Wiegand S, Gohlke B, Keiser S, i sur. BMI Z-Score (SDS) versus Calculated Body Fat Percentage: Association with Cardiometabolic Risk Factors in Obese Children and Adolescents. *Ann Nutr Metab.* 2024;80(1):29-36. doi: 10.1159/000535216
94. Burrows R, Correa-Burrows P, Reyes M, Blanco E, Albala C, Gahagan S. Healthy Chilean Adolescents with HOMA-IR ≥ 2.6 Have Increased Cardiometabolic Risk: Association with Genetic, Biological, and Environmental Factors. *J Diabetes Res.* 2015;2015:783296. doi: 10.1155/2015/783296
95. Baldrige AD, Perez-Atayde AR, Graeme-Cook F, Higgins L, Lavine JE. Idiopathic steatohepatitis in childhood: a multicenter retrospective study. *J Pediatr.* 1995;127(5):700-4. doi: 10.1016/s0022-3476(95)70156-7

96. Zimmet P, Alberti KG, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, i sur. The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes*. 2007;8(5):299-306. doi: 10.1111/j.1399-5448.2007.00271.x
97. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, i sur. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract*. 2019;157:107843. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843
98. Williams R, Karuranga S, Malanda B, Saeedi P, Basit A, Besancon S, i sur. Global and regional estimates and projections of diabetes-related health expenditure: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020;162:108072. doi: 10.1016/j.diabres.2020.108072
99. Pettitt DJ, Talton J, Dabelea D, Divers J, Imperatore G, Lawrence JM, i sur. Prevalence of diabetes in U.S. youth in 2009: the SEARCH for diabetes in youth study. *Diabetes Care*. 2014;37(2):402-8. doi: 10.2337/dc13-1838
100. Maffeis C, Birkebaek NH, Konstantinova M, Schwandt A, Vazeou A, Casteels K, i sur. Prevalence of underweight, overweight, and obesity in children and adolescents with type 1 diabetes: Data from the international SWEET registry. *Pediatr Diabetes*. 2018;19(7):1211-20. doi: 10.1111/medi.12730
101. Jones S, Khanolkar AR, Gevers E, Stephenson T, Amin R. Cardiovascular risk factors from diagnosis in children with type 1 diabetes mellitus: a longitudinal cohort study. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2019;7(1):e000625. doi: 10.1136/bmjdrc-2018-000625
102. Khawandanah J. Double or hybrid diabetes: A systematic review on disease prevalence, characteristics and risk factors. *Nutr Diabetes*. 2019;9(1):33. doi: 10.1038/s41387-019-0101-1
103. Jie KE, Goossens MH, van Oostrom O, Lilien MR, Verhaar MC. Circulating endothelial progenitor cell levels are higher during childhood than in adult life. *Atherosclerosis*. 2009;202(2):345-7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.05.012
104. Nadeau KJ, Regensteiner JG, Bauer TA, Brown MS, Dorosz JL, Hull A, i sur. Insulin resistance in adolescents with type 1 diabetes and its relationship to cardiovascular function. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(2):513-21. doi: 10.1210/jc.2009-1756
105. Rathsmann B, Rosfors S, Sjoholm A, Nystrom T. Early signs of atherosclerosis are associated with insulin resistance in non-obese adolescent and young adults with type 1 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2012;11:145. doi: 10.1186/1475-2840-11-145
106. Valle-Martos R, Valle M, Martos R, Canete R, Jimenez-Reina L, Canete MD. Liver Enzymes Correlate With Metabolic Syndrome, Inflammation, and Endothelial Dysfunction in

Prepubertal Children With Obesity. *Front Pediatr.* 2021;9:629346. doi: 10.3389/fped.2021.629346

107. Chan WK, Chuah KH, Rajaram RB, Lim LL, Ratnasingam J, Vethakkan SR. Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD): A State-of-the-Art Review. *J Obes Metab Syndr.* 2023;32(3):197-213. doi: 10.7570/jomes23052

108. Bulut T, Demirel F, Metin A. The prevalence of dyslipidemia and associated factors in children and adolescents with type 1 diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2017;30(2):181-7.

109. Urbina EM, Isom S, Bell RA, Bowlby DA, D'Agostino R, Jr., Daniels SR, i sur. Burden of Cardiovascular Risk Factors Over Time and Arterial Stiffness in Youth With Type 1 Diabetes Mellitus: The SEARCH for Diabetes in Youth Study. *J Am Heart Assoc.* 2019;8(13):e010150. doi: 10.1515/jpem-2016-0111

110. Silva L, Silva S, Oliveira AMS, Araujo JR, Arruda IKG, Maio R, i sur. Hypertriglyceridemic Waist and Associated Factors in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes Mellitus. *Rev Paul Pediatr.* 2020;38:e2019073. doi: 10.1590/1984-0462/2020/38/2019073

111. Szadkowska A, Baranowska-Jazwiecka A, Michalak A, Jarosz-Chobot P, Mysliwiec M, Glowinska-Olszewska B, i sur. Above 40% of Polish children and young adults with type 1 diabetes achieve international HbA1c target - results of a nationwide cross-sectional evaluation of glycemic control: The PolPeDiab HbA1c study. *Pediatr Diabetes.* 2021;22(7):1003-13. doi: 10.1111/pedi.13250

112. Cook S, Kavey RE. Dyslipidemia and pediatric obesity. *Pediatr Clin North Am.* 2011;58(6):1363-73, ix. doi: 10.1016/j.pcl.2011.09.003

113. Khan UI, McGinn AP, Isasi CR, Groisman-Perelstein A, Diamantis PM, Ginsberg M, i sur. Differences in Cardiometabolic Risk between Insulin-Sensitive and Insulin-Resistant Overweight and Obese Children. *Child Obes.* 2015;11(3):289-96. doi: 10.1089/chi.2014.0112

114. Flores-Calderon J, Gomez-Diaz RA, Rodriguez-Gomez G, Moran-Villota S. Frequency of increased aminotransferases levels and associated metabolic abnormalities in obese and overweight children of an elementary school in Mexico City. *Ann Hepatol.* 2005;4(4):279-83.

115. Peng L, Wu S, Zhou N, Zhu S, Liu Q, Li X. Clinical characteristics and risk factors of nonalcoholic fatty liver disease in children with obesity. *BMC Pediatr.* 2021;21(1):122. doi: 10.1186/s12887-021-02595-2

116. Eslam M, Alkhoury N, Vajro P, Baumann U, Weiss R, Socha P, i sur. Defining paediatric metabolic (dysfunction)-associated fatty liver disease: an international expert

consensus statement. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2021;6(10):864-73. doi: 10.1016/S2468-1253(21)00183-7

117. Almeda-Valdes P, Cuevas-Ramos D, Aguilar-Salinas CA. Metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*. 2009;8 Suppl 1:S18-24.

118. Zhang Y, Zhang H, Li P. Cardiovascular risk factors in children with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2019;32(7):699-705. doi: 10.1515/jpem-2018-0382

119. Maffeis C, Morandi A, Ventura E, Sabbion A, Contreas G, Tomasselli F, i sur. Diet, physical, and biochemical characteristics of children and adolescents with type 1 diabetes: relationship between dietary fat and glucose control. *Pediatr Diabetes*. 2012;13(2):137-46. doi: 10.1111/j.1399-5448.2011.00781.x

120. Petrie JR, Guzik TJ, Touyz RM. Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. *Can J Cardiol*. 2018;34(5):575-84. doi: 10.1016/j.cjca.2017.12.005

121. Kim HL. Arterial stiffness and hypertension. *Clin Hypertens*. 2023;29(1):31. doi: 10.1186/s40885-023-00258-1

122. McVeigh GE, Gibson W, Hamilton PK. Cardiovascular risk in the young type 1 diabetes population with a low 10-year, but high lifetime risk of cardiovascular disease. *Diabetes Obes Metab*. 2013;15(3):198-203. doi: 10.1111/dom.12013

123. Ceriello A, Ihnat MA, Thorpe JE. Clinical review 2: The "metabolic memory": is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(2):410-5. doi: 10.1210/jc.2008-1824

124. Shariq OA, McKenzie TJ. Obesity-related hypertension: a review of pathophysiology, management, and the role of metabolic surgery. *Gland Surg*. 2020;9(1):80-93. doi: 10.21037/gs.2019.12.03

125. Mihuta MS, Stoian D, Borlea A, Roi CM, Velea-Barta OA, Mozos I, i sur. Evaluating the Arterial Stiffness as a Useful Tool in the Management of Obese Children. *Children (Basel)*. 2023;10(2). doi: 10.3390/children10020183

126. Goksen D, Levent E, Kar S, Ozen S, Darcan S. Serum adiponectin and hsCRP levels and non-invasive radiological methods in the early diagnosis of cardiovascular system complications in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2013;5(3):174-81. doi: 10.4274/Jcrpe.1003

127. Smigoc Schweiger D, Battelino T, Groselj U. Sex-Related Differences in Cardiovascular Disease Risk Profile in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19). doi: 10.3390/ijms221910192

128. MacKenzie KE, Wiltshire EJ, Pena AS, Gent R, Hirte C, Piotto L, i sur. Hs-CRP is associated with weight, BMI, and female sex but not with endothelial function in children with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2009;10(1):44-51. doi: 10.1111/j.1399-5448.2008.00456.x
129. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, 3rd, Criqui M, i sur. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003;107(3):499-511. doi: 10.1161/01.cir.0000052939.59093.45
130. Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG, i sur. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet*. 2010;375(9709):132-40. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61717-7
131. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*. 2000;102(18):2165-8. doi: 10.1161/01.cir.102.18.2165
132. Schalkwijk CG, Poland DC, van Dijk W, Kok A, Emeis JJ, Drager AM, i sur. Plasma concentration of C-reactive protein is increased in type I diabetic patients without clinical macroangiopathy and correlates with markers of endothelial dysfunction: evidence for chronic inflammation. *Diabetologia*. 1999;42(3):351-7. doi: 10.1007/s001250051162
133. 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. *Diabet Med*. 2005;22(8):999-1004. doi: 10.1111/j.1464-5491.2005.01562.x
134. Coulon J, Willems D, Dorchy H. [Increase in C-reactive protein plasma levels during diabetes in infants and young adults]. *Presse Med*. 2005;34(2 Pt 1):89-93. doi: 10.1016/s0755-4982(05)88234-x
135. Lourenco BH, Cardoso MA, Team AS. C-reactive protein concentration predicts change in body mass index during childhood. *PLoS One*. 2014;9(3):e90357. doi: 10.1371/journal.pone.0090357
136. Soriano-Guillen L, Hernandez-Garcia B, Pita J, Dominguez-Garrido N, Del Rio-Camacho G, Rovira A. High-sensitivity C-reactive protein is a good marker of cardiovascular risk in obese children and adolescents. *Eur J Endocrinol*. 2008;159(1):R1-4. doi: 10.1530/EJE-08-0212

137. Salgado-Bernabe AB, Ramos-Arellanol LE, Guzman-Guzman IP, Munoz-Valle JF, Castro-Alarcon N, Vences-Velazquez A, i sur. Significant associations between C-reactive protein levels, body adiposity distribution and peripheral blood cells in school-age children. *Invest Clin*. 2016;57(2):120-30.
138. Carmona-Montesinos E, Ruiz-Fragoso Z, Ponce-Hinojosa G, Rivas-Arancibia S. Changes in C-Reactive Protein and Biochemical Profile in Preschool Children with Obesity. *Nutr Hosp*. 2015;32(4):1548-53. doi: 10.3305/nh.2015.32.4.9569
139. Miller M, Zhan M, Havas S. High attributable risk of elevated C-reactive protein level to conventional coronary heart disease risk factors: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med*. 2005;165(18):2063-8. doi: 10.1001/archinte.165.18.2063
140. Vassilopoulou E, Giannopoulou E, Theodosiou A, Karagiani E, Manios Y, Moschonis G. Adipokines and C-reactive protein as indicators of MetS presence in obese Greek children: The Healthy Growth Study. *Toxicol Rep*. 2021;8:1645-50. doi: 10.1016/j.toxrep.2021.08.004
141. Friend A, Craig L, Turner S. The prevalence of metabolic syndrome in children: a systematic review of the literature. *Metab Syndr Relat Disord*. 2013;11(2):71-80. doi: 10.1089/met.2012.0122
142. Klein RL, Hunter SJ, Jenkins AJ, Zheng D, Semler AJ, Clore J, i sur. Fibrinogen is a marker for nephropathy and peripheral vascular disease in type 1 diabetes: studies of plasma fibrinogen and fibrinogen gene polymorphism in the DCCT/EDIC cohort. *Diabetes Care*. 2003;26(5):1439-48. doi: 10.2337/diacare.26.5.1439
143. Hafez M, El-Masry S, Musa N, Fathy M, Hassan M, Hassan N, i sur. Relationship between visceral obesity and plasma fibrinogen in obese children. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2016;29(3):289-96. doi: 10.1515/jpem-2015-0264
144. Aleman MN, Diaz EI, Luciardi MC, Mariani AC, Bazan MC, Abregu AV. Hemostatic state of children with type 1 diabetes. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2021;26(2):99-104. doi: 10.4067/S0370-41062018005000501
145. Rodrigues TC, Snell-Bergeon JK, Maahs DM, Kinney GL, Rewers M. Higher fibrinogen levels predict progression of coronary artery calcification in adults with type 1 diabetes. *Atherosclerosis*. 2010;210(2):671-3. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.12.034
146. Alman AC, Talton JW, Wadwa RP, Urbina EM, Dolan LM, Hamman RF, i sur. Inflammation, adiposity, and progression of arterial stiffness in adolescents with type 1 diabetes: The SEARCH CVD Study. *J Diabetes Complications*. 2018;32(11):995-9. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2018.08.004

147. Azevedo WF, Cantalice AS, Gonzaga NC, Simoes MO, Guimaraes AL, Carvalho DF, i sur. Fibrinogen: cardiometabolic risk marker in obese or overweight children and adolescents. *J Pediatr (Rio J)*. 2015;91(5):464-70. doi: 10.1016/j.jped.2014.11.007
148. Wang Q, Wang Y, Xu D. The roles of T cells in obese adipose tissue inflammation. *Adipocyte*. 2021;10(1):435-45. doi: 10.1080/21623945.2021.1965314
149. Oras A, Peet A, Giese T, Tillmann V, Uibo R. A study of 51 subtypes of peripheral blood immune cells in newly diagnosed young type 1 diabetes patients. *Clin Exp Immunol*. 2019;198(1):57-70. doi: 10.1111/cei.13332
150. Thompson WS, Pekalski ML, Simons HZ, Smyth DJ, Castro-Dopico X, Guo H, i sur. Multi-parametric flow cytometric and genetic investigation of the peripheral B cell compartment in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2014;177(3):571-85. doi: 10.1111/cei.12362
151. Wadenpohl J, Seyfarth J, Hehenkamp P, Hoffmann M, Kummer S, Reinauer C, i sur. CD5-expressing CD8(+) T-cell subsets differ between children with type 1 diabetes and controls. *Immunol Cell Biol*. 2021;99(10):1077-84. doi: 10.1111/imcb.12488
152. Teniente-Serra A, Pizarro E, Quirant-Sanchez B, Fernandez MA, Vives-Pi M, Martinez-Caceres EM. Identifying Changes in Peripheral Lymphocyte Subpopulations in Adult Onset Type 1 Diabetes. *Front Immunol*. 2021;12:784110. doi: 10.3389/fimmu.2021.784110
153. Carolan E, Hogan AE, Corrigan M, Gaotswe G, O'Connell J, Foley N, i sur. The impact of childhood obesity on inflammation, innate immune cell frequency, and metabolic microRNA expression. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(3):E474-8. doi: 10.1210/jc.2013-3529
154. Min D, Brooks B, Wong J, Salomon R, Bao W, Harrisberg B, i sur. Alterations in monocyte CD16 in association with diabetes complications. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:649083. doi: 10.1155/2012/649083
155. Hedman M, Faresjo M, Axelsson S, Ludvigsson J, Casas R. Impaired CD4 and CD8 T cell phenotype and reduced chemokine secretion in recent-onset type 1 diabetic children. *Clin Exp Immunol*. 2008;153(3):360-8. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03720.x
156. Gallego-Suarez C, Bulan A, Hirschfeld E, Wachowiak P, Abrishami S, Griffin C, i sur. Enhanced Myeloid Leukocytes in Obese Children and Adolescents at Risk for Metabolic Impairment. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:327. doi: 10.3389/fendo.2020.00327
157. Calcaterra V, Croce S, Vinci F, De Silvestri A, Cordaro E, Regalbuto C, i sur. Th17 and Treg Balance in Children With Obesity and Metabolically Altered Status. *Front Pediatr*. 2020;8:591012. doi: 10.3389/fped.2020.591012

158. Leite F, Leite A, Santos A, Lima M, Barbosa J, Cosentino M, i sur. Predictors of Subclinical Inflammatory Obesity: Plasma Levels of Leptin, Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol and CD14 Expression of CD16+ Monocytes. *Obes Facts*. 2017;10(4):308-22. doi: 10.1159/000464294
159. Winer DA, Winer S, Chng MH, Shen L, Engleman EG. B Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(6):1033-43.. doi: 10.1007/s00018-013-1486-y
160. Schipper HS, Nuboer R, Prop S, van den Ham HJ, de Boer FK, Kesmir C, i sur. Systemic inflammation in childhood obesity: circulating inflammatory mediators and activated CD14++ monocytes. *Diabetologia*. 2012;55(10):2800-10. doi: 10.1007/s00125-012-2641-y
161. Bloem SJ, Roep BO. The elusive role of B lymphocytes and islet autoantibodies in (human) type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(7):1185-9. doi: 10.1007/s00125-017-4284-5
162. Boldison J, Wong FS. Regulatory B Cells: Role in Type 1 Diabetes. *Front Immunol*. 2021;12:746187. doi: 10.3389/fimmu.2021.746187
163. Ren X, Mou W, Su C, Chen X, Zhang H, Cao B, i sur. Increase in Peripheral Blood Intermediate Monocytes is Associated with the Development of Recent-Onset Type 1 Diabetes Mellitus in Children. *Int J Biol Sci*. 2017;13(2):209-18. doi: 10.7150/ijbs.15659
164. Devaraj S, Glaser N, Griffen S, Wang-Polagruto J, Miguelino E, Jialal I. Increased monocytic activity and biomarkers of inflammation in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2006;55(3):774-9. doi: 10.2337/diabetes.55.03.06.db05-1417
165. Peakman M, Warnock T, Vats A, McNab GL, Underhill J, Donaldson PT, i sur. Lymphocyte subset abnormalities, autoantibodies and their relationship with HLA DR types in children with type 1 (insulin-dependent) diabetes and their first degree relatives. *Diabetologia*. 1994;37(2):155-65. doi: 10.1007/s001250050087
166. Kadziela K, Kowalska H, Rymkiewicz-Kluczynska B, Kowalska M, Miskurka G, Rybczynska J, i sur. Changes in lymphocyte subsets in children with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2003;16(2):185-91. doi: 10.1515/jpem.2003.16.2.185
167. Keustermans G, van der Heijden LB, Boer B, Scholman R, Nuboer R, Pasterkamp G, i sur. Differential adipokine receptor expression on circulating leukocyte subsets in lean and obese children. *PLoS One*. 2017;12(10):e0187068. doi: 10.1515/jpem.2003.16.2.185
168. Luciardi MC, Carrizo TR, Diaz EI, Aleman MN, Bazan MC, Abregu AV. [Proinflammatory state in obese children]. *Rev Chil Pediatr*. 2018;89(3):346-51. doi: 10.4067/S0370-41062018005000501

169. Stone MJ, Hayward JA, Huang C, Z EH, Sanchez J. Mechanisms of Regulation of the Chemokine-Receptor Network. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2). doi: 10.3390/ijms18020342
170. Feng G, Hao D, Chai J. Processing of CXCL12 impedes the recruitment of endothelial progenitor cells in diabetic wound healing. *FEBS J.* 2014;281(22):5054-62. doi: 10.1111/febs.13043
171. Sayyed SG, Hagele H, Kulkarni OP, Endlich K, Segerer S, Eulberg D, i sur. Podocytes produce homeostatic chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12, which contributes to glomerulosclerosis, podocyte loss and albuminuria in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2009;52(11):2445-54. doi: 10.1007/s00125-009-1493-6
172. Siddiqi FS, Chen LH, Advani SL, Thai K, Batchu SN, Alghamdi TA, i sur. CXCR4 promotes renal tubular cell survival in male diabetic rats: implications for ligand inactivation in the human kidney. *Endocrinology.* 2015;156(3):1121-32. doi: 10.1210/en.2014-1650
173. Chang TT, Chen JW. The Role of Chemokines and Chemokine Receptors in Diabetic Nephropathy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9). doi: 10.3390/ijms21093172
174. Uno S, Imagawa A, Saisho K, Okita K, Iwahashi H, Hanafusa T, i sur. Expression of chemokines, CXC chemokine ligand 10 (CXCL10) and CXCR3 in the inflamed islets of patients with recent-onset autoimmune type 1 diabetes. *Endocr J.* 2010;57(11):991-6. doi: 10.1507/endocrj.k10e-076
175. Schulthess FT, Paroni F, Sauter NS, Shu L, Ribaux P, Haataja L, i sur. CXCL10 impairs beta cell function and viability in diabetes through TLR4 signaling. *Cell Metab.* 2009;9(2):125-39. doi: 10.1016/j.cmet.2009.01.003
176. Reijm S, Kwekkeboom JC, Blomberg NJ, Suurmond J, van der Woude D, Toes RE, i sur. Autoreactive B cells in rheumatoid arthritis include mainly activated CXCR3+ memory B cells and plasmablasts. *JCI Insight.* 2023;8(20). doi: 10.1172/jci.insight.172006
177. Deiuliis JA, Oghumu S, Duggineni D, Zhong J, Rutsky J, Banerjee A, i sur. CXCR3 modulates obesity-induced visceral adipose inflammation and systemic insulin resistance. *Obesity (Silver Spring).* 2014;22(5):1264-74. doi: 10.1002/oby.20642
178. Jamali Z, Nazari M, Khoramdelazad H, Hakimizadeh E, Mahmoodi M, Karimabad MN, i sur. Expression of CC chemokines CCL2, CCL5, and CCL11 is associated with duration of disease and complications in type-1 diabetes: a study on Iranian diabetic patients. *Clin Lab.* 2013;59(9-10):993-1001. doi: 10.7754/clin.lab.2012.120810
179. Samaan MC, Obeid J, Nguyen T, Thabane L, Timmons BW. Chemokine (C-C motif) Ligand 2 is a potential biomarker of inflammation & physical fitness in obese children: a cross-sectional study. *BMC Pediatr.* 2013;13:47. doi: 10.1186/1471-2431-13-47

180. Chatzigeorgiou A, Harokopos V, Mylona-Karagianni C, Tsouvalas E, Aidinis V, Kamper EF. The pattern of inflammatory/anti-inflammatory cytokines and chemokines in type 1 diabetic patients over time. *Ann Med*. 2010;42(6):426-38. doi: 10.3109/07853890.2010.495951
181. Kostopoulou E, Kalavrizioti D, Davoulou P, Papachristou E, Sinopidis X, Fouzas S, i sur. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Activin-A and Clusterin in Children and Adolescents with Obesity or Type-1 Diabetes Mellitus. *Diagnostics (Basel)*. 2024;14(4). doi: 10.3390/diagnostics14040450
182. Sell H, Eckel J. Chemotactic cytokines, obesity and type 2 diabetes: in vivo and in vitro evidence for a possible causal correlation? *Proc Nutr Soc*. 2009;68(4):378-84. doi: 10.1017/S0029665109990218
183. Scheu S, Ali S, Ruland C, Arolt V, Alferink J. The C-C Chemokines CCL17 and CCL22 and Their Receptor CCR4 in CNS Autoimmunity. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11). doi: 10.3390/ijms18112306
184. Bogacka J, Pawlik K, Ciapala K, Ciechanowska A, Mika J. CC Chemokine Receptor 4 (CCR4) as a Possible New Target for Therapy. *Int J Mol Sci*. 2022;23(24). doi: 10.3390/ijms232415638
185. Ollila TA, Sahin I, Olszewski AJ. Mogamulizumab: a new tool for management of cutaneous T-cell lymphoma. *Onco Targets Ther*. 2019;12:1085-94. doi: 10.2147/OTT.S165615
186. Lu L, Li J, Jiang X, Bai R. CXCR4/CXCL12 axis: "old" pathway as "novel" target for anti-inflammatory drug discovery. *Med Res Rev*. 2024;44(3):1189-220. doi: 10.1002/med.22011
187. Lai WY, Mueller A. Latest update on chemokine receptors as therapeutic targets. *Biochem Soc Trans*. 2021;49(3):1385-95. doi: 10.1042/BST20201114
188. Jiao H, Pang B, Chiang YC, Chen Q, Pan Q, Ren R, i sur. Structure basis for the modulation of CXC chemokine receptor 3 by antagonist AMG487. *Cell Discov*. 2023;9(1):119. doi: 10.1038/s41421-023-00617-0

11. ŽIVOTOPIS

Anita Špehar Uroić, rođena je 1976. godine u Zagrebu. Medicinski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu završila je 2001. godine, a tijekom studija je primila nagradu Rektora Sveučilišta u Zagrebu.

Stručni poslijediplomski studij „Klinička pedijatrija“ završila je 2005. godine, a znanstveni poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“, 2018 godine.

Radno iskustvo započela je 2001. godine pripravničkim stažem u Klinici za plućne bolesti Jordanovac, a potom u KBC Zagreb gdje je radila kao znanstveni novak u Katedri iz pedijatrije Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za koju je odradila i specijalizaciju iz pedijatrije te položila specijalistički ispit 2009. godine. 2017. godine subspecijalističkim ispitom završila je užu specijalizaciju iz pedijatrijske endokrinologije, dijabetesa i bolesti metabolizma. U tom je razdoblju sudjelovala i u izvođenju dodiplomske i postdiplomske nastave na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

U veljači 2020 godine stekla je naziv primarijus.

Od siječnja 2023 godine radi u Klinici za dječje bolesti Zagreb gdje je pokrenula endokrinološku i dijabetološku djelatnost u Klinici za pedijatriju.

Tijekom radnog vijeka aktivno se educira sudjelovanjem na brojnim domaćim i međunarodnim radionicama i tečajevima trajne edukacije, a svoje je radove prezentirala na nizu domaćih i međunarodnih kongresa.

Publicirala je preko 20 znanstvenih i stručnih radova u recenziranim domaćim i međunarodnim časopisima, kao i poglavlja u knjizi te priručnicima.