

Povezanost serumske aktivnosti dipeptidil peptidaze-4 s inzulinskom rezistencijom, metaboličkim sindromom i mikrovaskularnim komplikacijama u osoba sa šećernom bolešću tipa 1

Blaslov, Kristina

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:716966>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-06**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Kristina Blaslov

**Povezanost serumske aktivnosti
dipeptidil peptidaze-4 s inzulinskom
rezistencijom, metaboličkim
sindromom i mikrovaskularnim
komplikacijama u osoba sa šećernom
bolešću tipa 1**

DISERTACIJA



Zagreb, 2016.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Kristina Blaslov

**Povezanost serumske aktivnosti
dipeptidil peptidaze-4 s inzulinskom
rezistencijom, metaboličkim
sindromom i mikrovaskularnim
komplikacijama u osoba sa šećernom
bolešću tipa 1**

DISERTACIJA

Zagreb, 2016.

Disertacija je izrađena u Zavodu za šećernu bolest Sveučilišne klinike za dijabetes, endokrinologiju i bolesti metabolizma „Vuk Vrhovac“ Kliničke bolnice Merkur, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u okviru projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa: Metabolički sindrom u šećernoj bolesti tipa 1, br. 045-1080230-0516

Voditelj rada: prof. dr. sc. Lea Smirčić Duvnjak, prim. dr. med., specijalist internist-subspecijalist endokrinologije i dijabetologije

ZAHVALE

Osobi koja je odrednica mog stručnog i znanstvenog razvoja, **prof. dr. sc. Lei Smirčić Duvnjak, prim. dr. med.**, koja mi je ukazala na složenost problematike i potrebe za holističkim medicinskim i ljudskim pristupom dijabetološkom bolesniku, a potom konstruktivnim kritikama i savjetima pomogla u izradi disertacije od ideje do realizacije;

majci, Mladenki Pavić, koja u svim znanim oblicima kontinuirano podržava moj suživot sa medicinom i znanošću;

dr. sc. Matei Nikolac Perković (Institut Ruđer Bošković), **prim. dr. sc. Sandri Vučković Rebrina, dr. med. te prim. dr. sc. Martini Tomić, dr.med.** (Sveučilišna klinika Vuk Vrhovac) na nesebičnoj pomoći oko laboratorijske, neurološke odnosno oftalmološke obrade.

prijateljima i kolegama: **Zdravki, Josipi, Maji, Tomislavu i Ivi.**

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1 Definicija i epidemiologija šećerne bolesti	1
1.2. Dijagnostika, etiologija i klasifikacija šećerne bolesti.....	2
1.3 Šećerna bolest tip 1	5
1.4 Kronične komplikacije šećerne bolesti.....	8
1.4.1 Patogeneza mikrovaskularnih komplikacija u šećernoj bolesti tip 1.....	9
1.5 Inzulinska rezistencija	10
1.5.1 Patofiziologija inzulinske rezistencije	10
1.5.2 Metabolički sindrom.....	12
1.6 Dipeptidil peptidaza-4	15
1.6.1 Dipeptidil peptidaza-4 u šećernoj bolesti	21
2. HIPOTEZA	25
3. CILJEVI.....	25
4. ISPITANICI I METODE.....	26
4.1. Postupci.....	26
4.1.2 Procjena inzulinske rezistencije i dijagnoza metaboličkog sindroma.....	27
4.1.3 Aktivnost enzima DPP-4	27
4.1.4 Procjena bubrežne funkcije.....	29
4.1.5 Dijabetička retinopatija.....	29
4.1.6 Dijabetička neuropatija	30
4.2 Statistička raščlamba podataka.....	33
4.3 Etička načela	33
5. REZULTATI.....	34
5.1 Opća, klinička i laboratorijska obilježja svih ispitanika.....	34
5.2 Podjela ispitanika prema srednjoj vrijednosti DPP-4 aktivnosti.....	36
5.3 Korelacije i linearna logistička regresija	42
5.4 Binarna logistička regresija	44
6. RASPRAVA	48
7. ZAKLJUČAK	56
8. SAŽETAK.....	57
9. SUMMARY	58
10. LITERATURA.....	59
11. ŽIVOTOPIS	72

POPIS OZNAKA I KRATICA

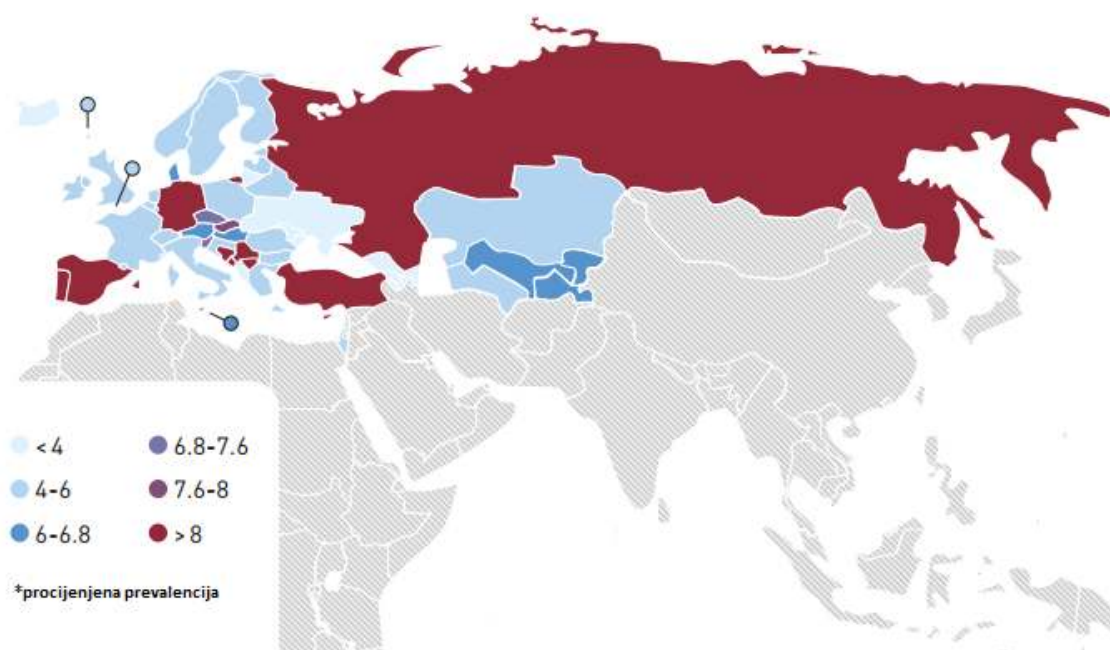
ACEI	inhibitor angiotenzin konvertaze
ALFKG	laserska fotokoagulacija retine
CKD EPI formula	eng. <i>Chronic Kidney Disease Epidemiology</i> formula
CRP	C-reaktivni protein
DCCT	eng. „ <i>The Diabetes Control and Complication Trial</i> “
DN	dijabetička polineuropatija
DPP-4	dipeptidil peptidaza-4 (eng. <i>dipeptidyl peptidase-4</i>)
eGDR formula	prosječna stopa raspoložive glukoze (eng. <i>estimated glucose disposal rate</i>)
ELISA	eng. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
GAD protutijela	protutijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (eng. <i>glutamic acid decarboxylase</i>)
GIP	insulintropni polipeptid ovisan o glukozi (eng. <i>glucose-dependent insulinotropic peptide</i> ili <i>gastric inhibitory polypeptide</i>)
GLP-1	peptid 1 sličan glukagonu (eng. <i>glucagon-like peptide 1</i>)
GLP-1R	receptor za peptid 1 sličan glukagonu
GLUT1	prijenosnik glukoze 1 (eng. <i>glucose transporter 1</i>)
HbA1c	glikirani hemoglobin (eng. <i>glycated haemoglobin</i>)
HDL kolesterol	kolesterol visoke gustoće (eng. <i>high density lipoprotein cholesterol</i>)
HLA	ljudski leukocitni antigen (eng. <i>human leukocyte antigen</i>)
IAA	protutijela na inzulin (eng. <i>insulin autoantibody</i>)
IA-2 protutijela	protutijela protein 2 udružena s inzulinomom (eng. <i>tyrosine phosphatase-related islet antigen 2</i>)
ICA	protutijela na β -stanicu gušterače (eng. <i>islet cell antibodies</i>)
IDF	eng. <i>International Diabetes Federation</i>
IR	inzulinska rezistencija
ITM	indeks tjelesne mase
LDL kolesterol	kolesterol male gustoće (eng. <i>low density lipoprotein</i>)

NCEP:ATP III kriteriji <i>Panel III</i>	<i>cholesterol</i> eng. „ <i>National Cholesterol Education Program:Adult Treatment</i> “
NIS	neuropatski bodovni sustav (eng. <i>Neuropathy Impairment Score</i>)
OGTT	oralni test opterećenja glukozom (eng. <i>oral glucose tolerance test</i>)
OS	opseg struka
MS	metabolički sindrom
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija (eng. <i>World Health Organization, WHO</i>)
ŠB	šećerna bolest
VLDL kolesterol	kolesterol vrlo male gustoće (eng. <i>very low density lipoprotein cholesterol</i>)
ZNT8	protutijela na prijenosnik cinka (eng. <i>zinc transporter 8 antibody</i>)

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1 Definicija i epidemiologija šećerne bolesti

Šećerna bolest (ŠB) obuhvaća poremećaj metabolizma ugljikohidrata, masti i bjelančevina koji nastaju uslijed apsolutnog ili relativnog manjka lučenja inzulina ili oboje, a koji se klinički manifestiraju kroničnom hiperglikemijom (1). Prema procjenama Međunarodne dijabetičke federacije (International Diabetes Federation, IDF), učestalost ŠB u svijetu 2013. godine iznosila je 6,8 %, a u Europi 8,5% za dobnu skupinu od 20-79 godina (Slika 1.1.). Predviđa se da će učestalost broja oboljelih porasti za 55%, odnosno da će porasti sa 382 na 592 milijuna na svjetskoj razini u razdoblju od 2013. do 2035. godine (2). Prema istom izvoru, u Republici Hrvatskoj 6.86 % odrasle populacije ima ŠB, a procjenjuje se da je u istoj dobnoj skupini i do 3% još uvijek nedijagnosticiranih bolesnika.



Slika 1.1. Procijenjena prevalencija ŠB u Europi za 2014.godinu
Modificirano prema: *IDF, Diabetes Atlas 6th edition, 2013.; 2014.update*

1.2. Dijagnostika, etiologija i klasifikacija šećerne bolesti

Prema trenutno vrijedećim preporukama Svjetske zdravstvene organizacije (World Health Organisation, WHO) i Američkog dijabetološkog udruženja (American Diabetes Association, ADA), „zlatnim standardom“ za postavljanje dijagnoze ŠB smatraju se: koncentracija glukoze u venskoj plazmi iznad 7,0 mmol/L natašte, odnosno 11,1 mmol/L dva sata nakon testa oralnog opterećenja glukozom (prema eng. oral glucose tolerance test, OGTT) (3, 4) (Tablica 1.). Ukoliko osoba ne zadovoljava kriterije za ŠB, ali ipak nema normalnu razinu glukoze u venskoj plazmi natašte ili nakon OGTT-a, takvo se stanje naziva **predijabetes**.

Ovdje je važno razlikovati: poremećaj tolerancije glukoze natašte (eng. „impaired fasting glucose“) i poremećaj tolerancije glukoze (prema eng. „impaired glucose tolerance“) (Tablica 1.). Predijabetes prema dosadašnjim saznanjima nosi 40%-tni rizik da će osoba unutar 5 godina razviti klinički manifestni oblik ŠB, a također nosi i rizik od nastanka kroničnih komplikacija bolesti (5, 6). Stoga je dijagnostička vrijednost koncentracije glukoze u plazmi natašte od 7 mmol/L određena prema rezultatima velikih epidemioloških studija iz 1990.-ih, DCCT (eng. Diabetes Control and Complications Trial) (7) i UKPDS (eng. United Kingdom Prospective Diabetes Study) (8), koji su pokazali da se rizik od mikrovaskularnih komplikacija pri istoj vrijednosti naglo povećava, *de facto* arbitrarna.

Dodatno, iste su studije ukazale na povezanost između vrijednosti glikiranog hemoglobina (eng. glycated haemoglobin A1c, HbA1c) i razvoja vaskularnih komplikacija ŠB (9). HbA1c je izravni produkt post-translacijskog vezanja glukoze na molekule hemoglobina, a odražava prosječnu koncentraciju glukoze u krvi tijekom prethodna 3 mjeseca, koliki je prosječni životni vijek eritrocita (10). Predstavlja opće prihvaćeni standard prema kojemu se procjenjuje kako učinkovitost liječenja, tako i rizik od razvoja kasnih komplikacija ŠB. Dugogodišnja klinička primjena HbA1c stvorila je temelj za racionalizaciju laboratorijske standardizacije testova za HbA1c što je značajno unaprijedilo reproducibilnost određivanja i međulaboratorijsku harmonizaciju rezultata vrijednosti HbA1c. Zbog toga je od 2011. godine vrijednost HbA1c $\geq 6,5\%$, uz do tada važeće kriterije vrijednosti koncentracije glukoze natašte te OGTT priznat kao dijagnostički kriterij ŠB (11).

Tablica 1. Dijagnostički kriteriji za šećernu bolest (prema referencama 3, 4, 11).

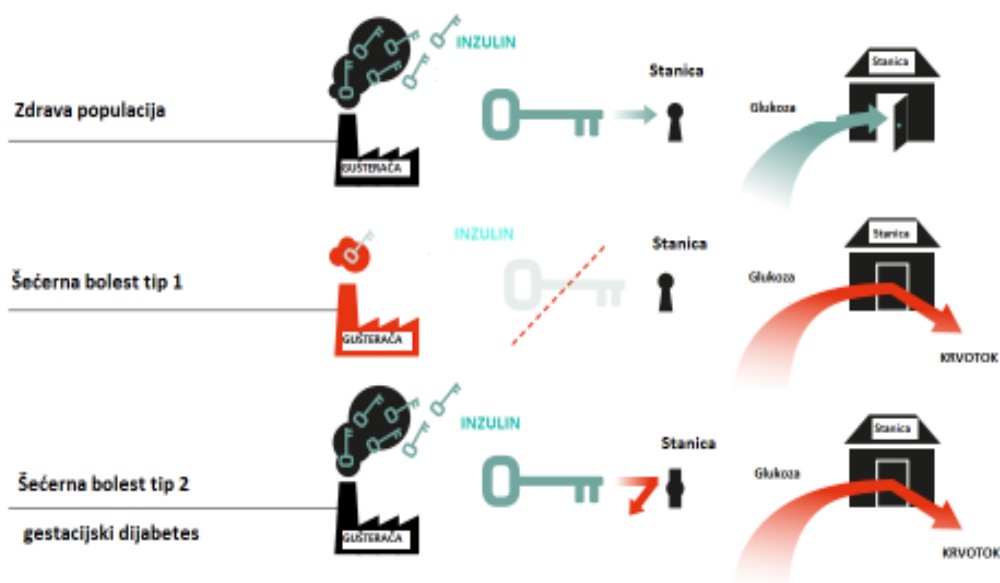
	UZORAK		
	Plazma	Kapilarna krv	Puna krv
Glukoza natašte (mmol/L)			
Uredan nalaz	<6,1	<5,6	<5,6
Poremećena tolerancija glukoze natašte	6,1-6,9	5,6-6,0	5,6-6,0
Šećerna bolest	≥7,0	≥6,1	≥6,1
Glukoza 2 h postprandijalno			
Uredan nalaz	<7,8	<7,8	<6,7
Poremećena tolerancija glukoze	7,8-11,0	7,8-11,0	6,7-9,9
Šećerna bolest	≥11,1	≥11,1	≥10,0
HbA1c (%)			
Uredan nalaz	-	≤5,7	≤5,7
Predijabetes	-	5,7-6,4	5,7-6,4
Šećerna bolest	-	≥6,5	≥6,5

Iako je kretanje koncentracije glukoze u plazmi složeni proces koji podrazumijeva nekoliko različitih hormonskih i drugih signalnih puteva, ključnu ulogu u glukoregulaciji ima inzulin, polipeptidni hormon koji se sintetizira se u beta (β) stanicama Langerhansovih otočića u gušterači (1). Ljudska gušterača sadrži oko milijun otočića, a u svakom se nalazi oko 1000 endokrinih stanica unutar kojih je inzulin uskladišten unutar sekretornih granula u obliku preproinzulina te proinzulina. Inzulin se oslobađa bifazično, a osnovni podražaj za lučenje je glukoza. Takozvana „prva faza“ je kratkotrajna, traje desetak minuta, a slijedi nakon porasta koncentracije glukoze u krvi, obično izazvanim obrokom bogatim ugljikohidratima. Druga faza sekrecije inzulina je dugotrajna, ona pokriva osnovne metaboličke potrebe organizma, te je odgovorna za održavanje koncentracije glukoze u krvi u preprandijalnom stanju, ali i za čitav niz drugih učinaka. Inzulin se luči u portalni krvotok, a svoj učinak ostvaruje putem svog receptora na perifernoj stanici koji pripada porodici tirozin kinaza. Nakon što se spoji s inzulinom, receptor se aktivira, fosforilira aminokiseline proteina koji se zove supstrat za

inzulinski receptor 1 (eng. Insulin Receptor Substrate 1, IRS 1). Kaskadno se aktivira niz staničnih proteina što rezultira pomakom specifičnog prijenosnika za glukozu 4 (eng. glucose transporter 4, GLUT4) prema staničnoj membrani. Zadaća ovog transportera je prijenos glukoze iz plazme u unutrašnjost stanice procesom olakšane pasivne difuzije. Ukoliko dođe do poremećaja u bilo kojem dijelu opisanog puta ulaska glukoze u stanice, razvija se ŠB (Slika 1.3.) (1, 8).

U skladu s navedenim, trenutno važeća klasifikacija ŠB temelji se na pretpostavci različite patofiziološke osnove razvoja hiperglikemije, a obuhvaća četiri osnovne kategorije bolesti (11):

- tip 1 ŠB koji podrazumijeva uništenje β gušteračnih stanica uslijed autoimunog ili idiopatskog procesa
- tip 2 ŠB u čijoj se podlozi nalazi relativna inzulinopenija uslijed smanjene osjetljivosti perifernih tkiva na inzulin
- gestacijski dijabetes
- specifični tipovi ŠB kao što su:
 - monogenetskim mutacijama uzrokovana ŠB;
 - bolesti egzokrinog dijela gušterače;
 - endokrinopatije
 - steroidima inducirana ŠB



Slika 1.2. Patofiziološka osnova osnovnih skupina ŠB.
 Modificirano prema: *IDF, Diabetes Atlas 6th edition, 2013.*

1.3 Šećerna bolest tip 1

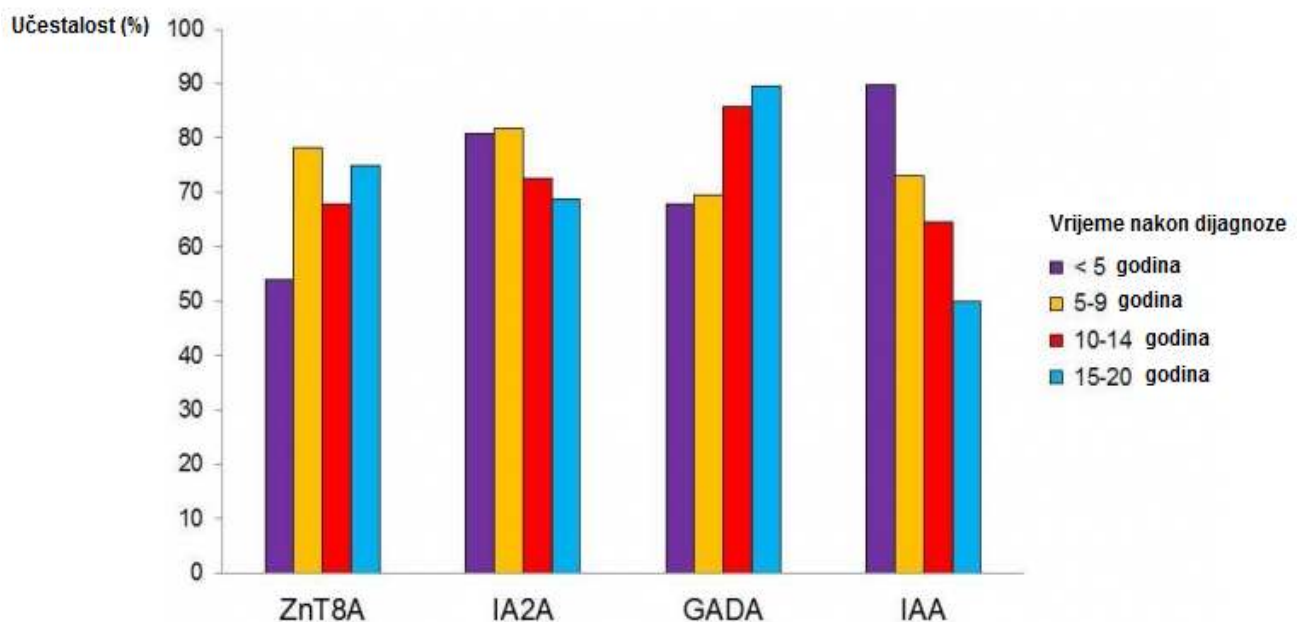
Tip 1 ili inzulin-ovisan (eng. Insulin Dependent Diabetes Mellitus, IDDM) oblik ŠB karakterizira imunološki posredovano uništenje β stanica Langerhansovih otočića gušterače koje se može manifestirati u bilo kojoj životnoj dobi (Slika 1.3) (9-12). Prema ADA klasifikaciji, ovaj se oblik dijeli na protutijelima posredovani (tip 1A) te idiopatski oblik ŠB tip 1 (tip 1B) u kojeg se prisutnost protutijela, ni drugog poznatog uzroka progresivnog gubitka β stanica (npr. pankreatitis ili neki oblici monogenetske ŠB) ne može dokazati, no on je ipak prisutan (13).

Obje se podskupine češće javljaju u djece i adolescenata nego u odraslih (14), ali njihova zastupljenost je različita ovisno o promatranoj populaciji. U azijskih je zemalja zastupljenija podskupina 1B, dok se ista u bijelaca javlja sa učestalošću <10% od svih osoba sa ŠB tipa 1 (11, 14).

Iako se pripadnost pojedinim podskupinama ljudskog leukocitnog antigenskog sustava (eng. human leukocyte antigen, HLA) smatra karakterističnom za tip 1A ŠB, i najčešći HLA (DR3-DQ2/DR4-DQ8) genotip nalazi se u svega 20-50% bolesnika s ovim oblikom bolesti (15, 16). U najvećem broju slučajeva obje podskupine karakterizira akutna klinička prezentacija bolesti, nerijetko praćena ketozom ili pak ketoacidozom te potreba za nadomjesnim

liječenjem inzulinom unutar godine dana od dijagnoze (17). Uzevši u obzir i mogućnosti kliničke dijagnostike bilo bi ispravnije govoriti o protutijelima pozitivnom i protutijelima negativnom obliku ŠB tip 1. Ipak, subklasifikacija nije tek od akademskog značaja jer su osobe sa podtipom 1A ŠB tipa 1 sklonije razvoju drugih autoimunih procesa: Adisonove bolesti, celijakije, bolesti štitne žlijezde te perniciozne anemije (18-20).

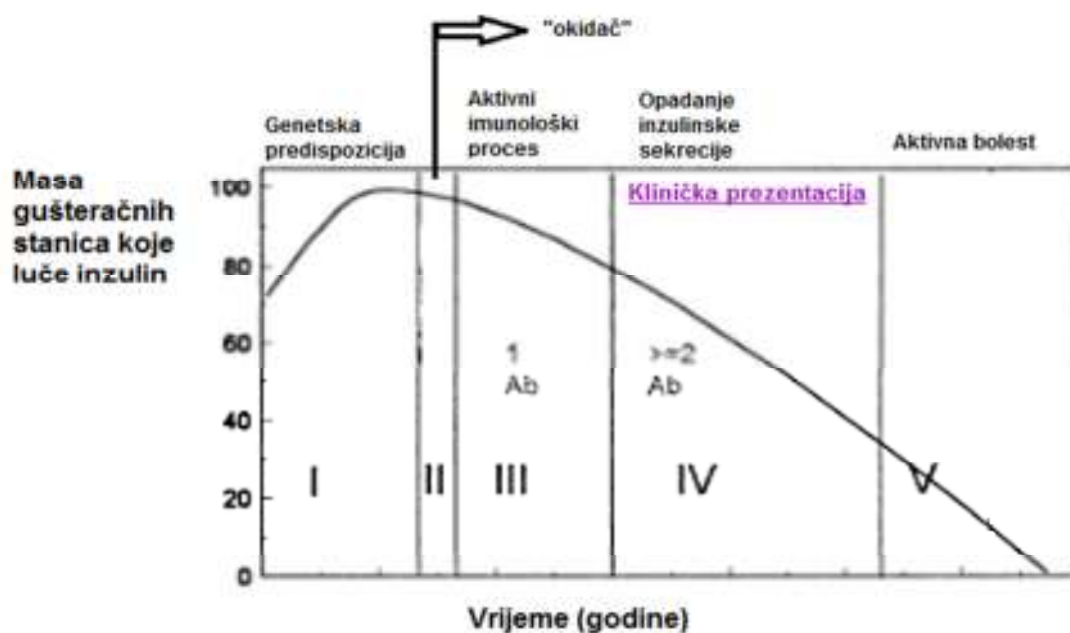
Do danas je identificirano nekoliko protutijela karakterističnih za ŠB tip 1, a to su: protutijela na endogeni inzulin (eng. insulin autoantibody, IAA) (21), protutijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline (eng. glutamic acid decarboxylase, GAD65) (22), protutijela protein 2 udružena s inzulinomom (eng. insulinoma-associated protein 2, IA-2) (23-25), podskupina protutijela na β -stanicu gušterače (eng. islet cell autoantibody, ICA) (26) te protutijela na prijenosnik cinka (eng. zinc transporter 8 antibody, ZNT8) (27). Iako nema specifičnog obrasca kojim redoslijedom se navedena protutijela pojavljuju pretpostavlja se da su IAA prisutna prva, međutim su do vremena dijagnoze nerijetko odsutna, dok se preostala pojavljuju u otprilike slično vrijeme, s time da se GAD65 zadržava najduže te se može dokazati i do 20 godina nakon postavljanja dijagnoze (Slika 1.4) (28, 29).



Slika 1.3.

Modificirano prema: <http://www.diapedia.org/type-1-diabetes-mellitus/insulin-autoantibodies>, pristupljeno 15.8.2015.

Pored rasne pripadnosti i složene poligenetske predispozicije, u razvoj tipa 1 ŠB uključeni su i mnogi okolišni čimbenici, osobito prehrambene navike (30) te virusne infekcije (31-34) koje se smatra tzv. „okidačima“ za razvoj protutijelima posredovanog uništenja β gušteračnih stanica. Kada proces otpočne inzulinska sekrecija progresivno opada tako da je u trenutku kliničke prezentacije bolesti u većini slučajeva moguće dokazati barem 2 cirkulirajuća protutijela (Slika 1.5). S obzirom na ranije spomenuti obrazac pojavljivanja i nestajanja istih, smatra se kako istovremena prisutnost ICA i GAD protutijela sa specifičnošću od 100% i osjetljivošću 89,4% od točno identificiraju individue sa ŠB tip 1 podskupine 1A (32).



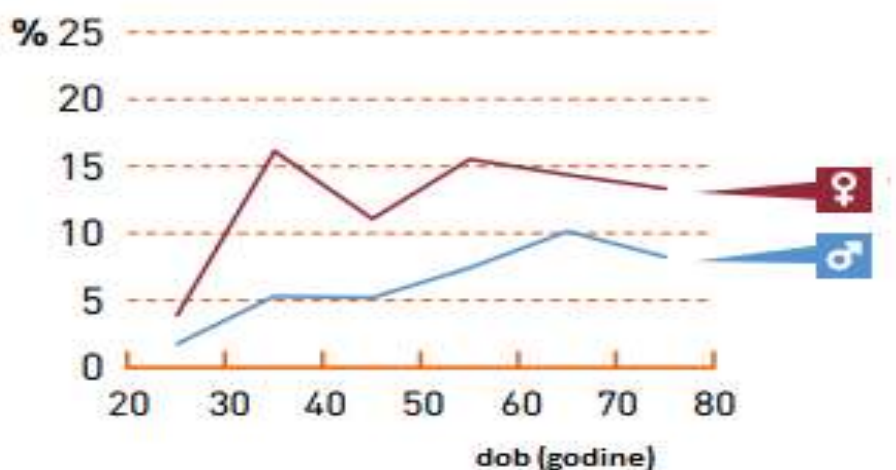
Slika 1.4. Tijek razvoja ŠB tip 1 (podskupina 1A)

*Legenda: Ab-protutijelo, *prema eng. antibody*

Zaključno, ŠB tip 1 je složena polietiološka autoimuna bolest u čijem razvoju protutijela na gušteraču, metaboličke promjene, genski te okolišni čimbenici imaju zajednički ulog.

1.4 Kronične komplikacije šećerne bolesti

Tijek ŠB obilježen je razvojem akutnih i kroničnih komplikacija. Akutne se komplikacije (ketoacidoza, hiperosmolarno stanje i hiperosmolarna neketozna koma, hipoglikemije i hipoglikemijska koma) zbog sve bolje i ranije dijagnostike, kao i farmakološkog napretka, u razvijenim zemljama pojavljuju tek sporadično, dok su kronične komplikacije glavni uzrok preuranjene smrtnosti osoba sa ŠB (35, 36). Najnovije procjene govore o udjelu od čak 11% u sveukupnoj smrtnosti europske regije i udjelima od preko 15% u svim dobnim skupinama ženske populacije (Slika 1.2.) (37). Kronične komplikacije ŠB dijele se u dvije velike podskupine: **mikroangiopatske (mikrovaskularne)** i **makroangiopatske (makrovaskularne)** promjene (1). Makroangiopatija zahvaća koronarne, cerebrovaskularne te krvne žile okrajina; dok mikroangiopatija zahvaća male krvne žile svih organa, ali najprije i najčešće krvne žile mrežnice, perifernih živaca te glomerula bubrega te je vodeći uzrok morbiditeta među osobama sa ŠB. Zbog rastućeg broja oboljelih, kao i socijalnih te zdravstveno-ekonomskih opterećenja, temeljni značaj liječenja šećerne bolesti počiva na prevenciji i liječenju makrovaskularnih i mikrovaskularnih komplikacija.



Slika 1.5. Udio svih smrti pripisivih kroničnim komplikacijama šećerne bolesti, prema dobi i spolu, Europa, 2013.

Modificirano prema: *IDF, Diabetes Atlas 6th edition, 2013.*

1.4.1 Patogeneza mikrovaskularnih komplikacija u šećernoj bolesti tip 1

Mikrovaskularne komplikacije čine dijabetička bolest bubrega, dijabetička retinopatija (neproliferativne i proliferativna) te dijabetička neuropatija (senzorna, motorička te autonomna), a do danas je razrađeno nekoliko teorija o direktnom i indirektnom mehanizmu utjecaja hiperglikemije na razvoj **unutarstaničnog unutarmitohondrijskog oksidativnog stresa**; osnovnog patofiziološkog pokretača njihova nastanka. Kronična hiperglikemija potiče stvaranje uznapredovalih produkata metabolizma glukoze koji potom induciraju poremećaj endotela, remete ravnotežu citokina i faktora rasta te posljednično mijenjaju sastav i strukturu izvanstaničnog matriksa (38, 39). Ujecaj hiperglikemije na razvoj mikrovaskularnih komplikacija svakako potvrđuje i spoznaja da smanjenje HbA1c za 2 % smanjuje incidenciju dijabetičke bolesti bubrega za 54 %, a retinopatije za 76% (40). Stanja akutne hiperglikemije, odnosno, fluktuacije glukoze s druge strane posredstvom enzima aldoza-reduktaze dovode do pojačanog nakupljanja sorbitola unutar stanice. Time se mijenja njena osmolalnost kao i redoks-potencijal stvarajući predispoziciju razvoja kroničnih mikroangiopatiskih promjena (41, 42).

Dodatno, povećana stanična dispozicija glukoze rezultira povećanim stvaranjem slobodnih masnih kiselina te diacil-glicerola koji interferiraju sa unutarstaničnim inzulinskim signalizacijskim putem (43) rezultirajući inzulinskom rezistencijom (IR) te posljedničnom dislipidemijom. Oba faktora su dokazano povezana s povišenim rizikom razvoja mikrovaskularnih komplikacija (44, 45). U konačnici, IR pozitivnom povratnom spregom potom aktivira glukozamin 6-fosfatni put, relativno inaktivan put razgradnje glukoze do glukozamin 6-fosfata koji u normalnim uvjetima čini neznatni dio staničnog metabolizma glukoze, a njegova pojačana aktivacija, zbog sniženja razine adenozin trifosfata (ATP) u stanicama, inhibira prijenos inzulinskog signala, od inzulinskog receptora do transportera glukoze (46). Na ovaj se način zatvara *circulus vitiosus* u patogenezi razvoja komplikacija, ali i stavlja naglasak na IR koja se javlja u svim oblicima ŠB, makar i posljedično, a ne samo u tipu 2 ŠB kako je to općenito prihvaćeno (47-49).

Iako prevladava stav da prisustvo metaboličkih promjena u samim stanicama endotela ujedno znači visoki rizik nastanka mikroangiopatije, one same zasigurno nisu dovoljne za njen razvoj. Vjerojatno drugi čimbenici kao što su nasljedna osnova i čimbenici okoline imaju ulogu u određivanju onih bolesnika koji će razviti agresivnu angiopatiju (50).

1.5 Inzulinska rezistencija

Pojam inzulinske rezistencije (IR) ukazuje na nemogućnost da održano ili čak prekomjerno lučenje inzulina uspostavi homeostazu glukoze u cirkulaciji. Kod kompenziranog poremećaja, hiperglikemija zbog nedovoljne inzulinske aktivnosti potiče pojačano lučenje inzulina, što omogućuje ponovno postizanje normoglikemije te predisponira razvoju tipa 2 ŠB (51).

Utjecaj inzulina na metabolizam proteina i lipida, proliferaciju i diferencijaciju stanica, kao i na proizvodnju dušičnog oksida (NO) pri tome je često zanemaren, a taj upravo čini važan dio patofiziološke osovine utjecaja IR na razvoj raznih patoloških stanja povezanih sa ŠB, odnosno vaskularnih komplikacija bolesti (52).

1.5.1 Patofiziologija inzulinske rezistencije

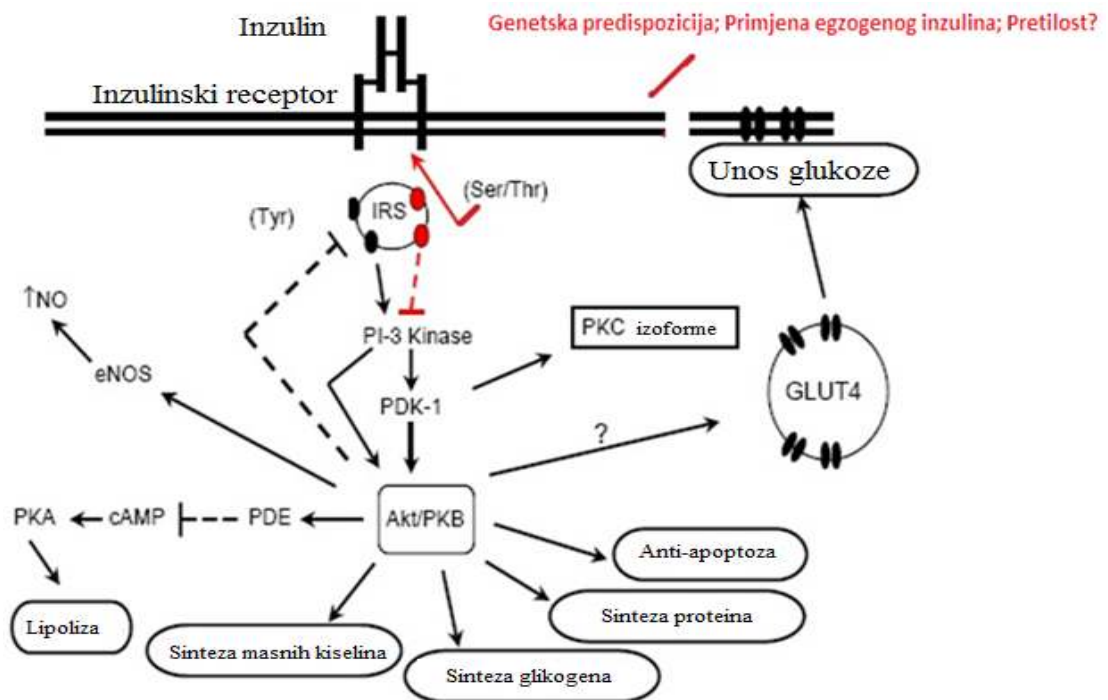
Premda sama molekularno biološka podloga IR nije do kraja objašnjena, smatra se da ona može nastati zbog **prereceptorskih poremećaja** (obično zbog cirkulirajućih protutijela na inzulina koja onemogućuju adekvatno vezivanje inzulina na svoj receptor), poremećaja **broja i strukture samog receptora** za inzulina (prisustvo protutijela na inzulinski receptor, kod mutacija gena odgovornog za sintezu inzulinskog receptora), kao i zbog promjena u **postreceptorskim unutarstaničnim signalnim putevima** što se viđa kod mnogih bolesti i stanja kao što su pretilost, lipoatrofična ŠB, jetrenih bolesti, mišićne inaktivnosti, te suviška kontraregulatornih hormona poput glukokortikoida, hormona rasta, te kateholamina. Prereceptorski i receptorski poremećaji koji dovode do IR su razmjerno rijetki (51). Kod osoba s hiperinzulinemijom nađen manji broj receptora za inzulina zbog njihove internalizacije, odnosno povlačenja aktivnih receptora sa stanične površine u unutrašnjost stanice te nedovoljnu regeneraciju inzulinskog receptora iz kompleksa s inulinom koji stoga ostaje zarobljen unutar stanice. Ipak, daleko najčešći mehanizam nastanka inzulinske rezistencije su postreceptorski poremećaji (52).

Postoje dva značajna, po biološkom učinku bitno različita unutarstanična postreceptorska signalna puta. Prvi uključuje fosforilaciju tirozinskih ostataka supstrata 1 za inzulinski receptor (IRS-1), te posljedičnu aktivaciju fosfatidilinozitol protein kinaze 3 (PIK-3) koja je odgovorna za metaboličke učinke inzulina, poput regulacije razine glukoze u krvi, ulaska glukoze u stanice u perifernih tkivima, sinteze glikogena u jetri, ali i sinteze NO. Nedostatna sinteza NO zbog blokirane aktivnosti PIK-3 dovodi do endotelne disfunkcije. S obzirom da

NO posjeduje vazodilatatorna i antiaterogena svojstva, njegov nedostatak dovodi do ravoja vaskularnih komplikacija (52).

Drugi signalni put koji se aktivira nakon stimulacije inzulinskog receptora inzulinom uključuje fosforilaciju serinskih ostataka na IRS-1, te aktivaciju mitogen-aktiviranih proteina (eng. mytogen activated protein, MAP) odgovarajućim kinazama. Ovim putem inzulin ostvaruje svoju mitogenu aktivnost putem aktivacije gena u jezgri stanice, uključujući i učinke na proliferaciju glatkih mišićnih stanica endotela krvnih žila, ali bez direktnog metaboličkog učinka. Aktivacija MAP kinaze dovodi i do aktiviranja proinflamatornih signalnih puteva, koji uključuju inhibitor nuklearnog faktora (NF) $\kappa\beta$, te c-jun N terminalnu kinazu, što može pogoršati stupanj neosjetljivosti na inzulin. Naime, proupalni citokini kao krajnji produkti aktiviranih proupalnih signalnih puteva pojačavaju fosforilaciju serinskih ostataka na IRS-1, zatvarajući na taj način *circulus vitiosus* (53-56) (Slika 1.6).

Pojam IR u kliničkom kontekstu obuhvaća hiperglikemiju, dislipidemiju i arterijsku hipertenziju te čini okosnicu metaboličkog sindroma (MS) koji je prisutan i u do 40% osoba sa tipom 1 ŠB (57).



Slika 1.6. Mehanizam nastanka inzulinske rezistencije u ŠB tip 1

1.5.2 Metabolički sindrom

Metabolički sindrom označava skup metaboličkih poremećaja povezanih sa stanjem IR te prekomjernom tjelesnom težinom, a kao takav predstavlja jedan od najvažnijih rizičnih čimbenika vaskularnih oboljenja (58, 59). Dva glavna čimbenika koja uzrokuju razvoj MS su visceralna pretilost i IR. Rizik povezan sa visceralnom pretilošću je najbolje identificiran povećanjem opsega koji dokazano visoko korelira sa stupnjem IR. Metaboličke studije pokazuju da je povećan opseg struka povezan s povećanjem incidencije kardiovaskularnih incidenata i IR (60).

U cilju olakšane identificiranje bolesnika s aterogenim/dijabetogenim metaboličkim poremećajima u kliničkoj praksi, mnoga stručna društva za donošenje konsenzusa pokušala su dati jednostavnu, klinički lako primjenjivu definiciju MS. Prvu definiciju MS dala je WHO 1998. godine. Glavni rizični čimbenik bila je IR, a dijagnoza se mogla postaviti za bolesnike koji imaju IR i još dva dodatna od sljedećih čimbenika rizika: pretilost, hipertenziju, povišenu koncentraciju triglicerida, sniženu koncentraciju HDL- kolesterola i mikroalbuminuriju. Ubrzo je uslijedila definicija Europske grupe za istraživanje inzulinske rezistencije (EGIR), a dvije godine kasnije, 2001. i Nacionalni program Sjedinjenih Američkih država obrazovanja o kolesterolu, Panel liječenja za odrasle III (National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III, NCEP ATP III) donio je svoje kriterije za dijagnozu MS. Njihov kriterij nije zahtijevao prisustvo IR, nego prisutnost tri od pet čimbenika rizika koji su uključivali abdominalnu pretilost koja dokazano visoko korelira s inzulinskom rezistencijom, povišenu koncentraciju triglicerida, sniženu koncentraciju HDL-a, povišen krvni tlak i povišenu koncentraciju glukoze natašte (poremećenu toleranciju glukoze natašte ili tip 2 ŠB. Postojanje nekoliko definicija istog sindroma je uzrokovalo brojne rasprave oko toga koja je bolja, a istodobno je bilo vrlo teško izravno uspoređivati podatke iz studija koje su koristile različite definicije sindroma (61).

Zbog tih je razloga IDF 2005. dao vlastitu definiciju MS čije su se smjernice mogle lako primijeniti i u kliničkoj praksi. IDF i Američko društvo za srce/Institut za srce, pluća i krv (American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute, AHA/NHLBI) pokušali su uskladiti postojeće definicije 2005. godine, a koji su kasnije, 2009. godine i revidirani (62). IDF je odustao od kriterija IR koji je dala WHO, ali je zahtijevao postojanje abdominalne pretilosti kao jednog od pet čimbenika rizika za dijagnozu. Ostali kriteriji slagali su se s kriterijima NCEP ATP III. AHA/NHLBI nisu naveli abdominalnu pretilost kao

obvezan rizični čimbenik, a ostali kriteriji za dijagnozu slagali su se s kriterijima IDF-a. Vrijednosti koje IDF koristi za mjerenje opsega struka (OS < 94 cm za muškarce; OS < 80 cm za žene) odgovaraju vrijednostima indeksa tjelesne mase (BMI; eng. body mass index) od 25 kg/m², dok vrijednosti koje koristi AHA/NHLBI (OS < 102 cm za muškarce; OS < 88 cm za žene) odgovaraju vrijednostima ITM-a oko 30 kg/m². S obzirom na činjenicu da je većina osoba sa ŠB tipa 1 nije pretila, kada govorimo o definiranju MS u ŠB tipa 1, prikladnije je koristiti IDF definiciju stanja. Prisutnost MS u osoba s tipom 1 ŠB predstavlja neovisni rizični čimbenik razvoja i progresije mikrovaskularnih komplikacija (63, 64).

Tablica 2. Kriteriji za kliničku dijagnozu metaboličkog sindroma: potrebna je istovremena prisutnost tri od pet navedenih čimbenika

Čimbenik	Vrijednost
Opseg struka (cm) (specifično za pojedine populacije*)	>80 cm za žene >94 cm za muškarce
Koncentracija triglicerida u plazmi (mmol/L)	≥1.7 mmol/L
Liječenje trigliceridemije lijekovima	
Koncentracija HDL-kolesterola u plazmi (mmol/L)	<1.3 mmol/L za žene <1.0 mmol/L za muškarce
Vrijednost arterijskog tlaka (mmHg)/	Sistolički >130 mmHg i/ili
Liječenje povišenog krvnog tlaka lijekovima	Dijastolički ≥85 mmHg
Povišena koncentracija glukoze natašte (mmol/L)/	≥5.6 mmol/L
Liječenje hiperglikemije lijekovima	

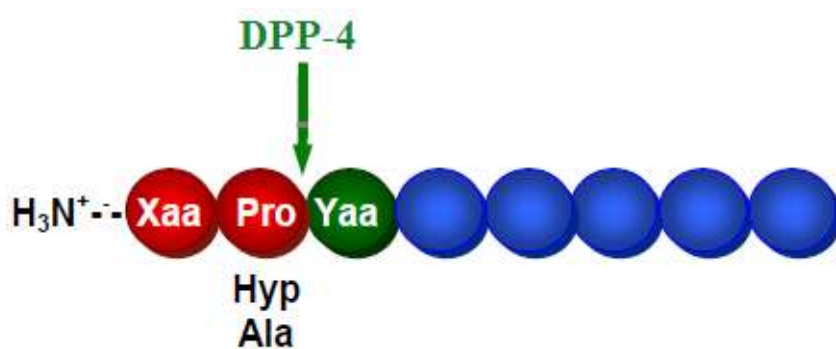
Legenda: *euroljani; bijela rasa

Prekomjerni kalorijski unos, praćen smanjenom ili nikakvom tjelesnom aktivnošću, potpomognut genetskim čimbenicima, neophodno dovodi do nakupljanja masnog tkiva u organizmu. Zbog svoje parakrine i sistemske endokrine funkcije masno tkivo utječe na energetska homeostazu, inzulinsku osjetljivost, metabolizam lipida, upalu i imunološki sustav (60). Za razliku od subkutanog masnog tkiva, visceralno masno tkivo je metabolički aktivni organ koji luči različite molekule nazvane adipo(cito)kini (65, 66). Adipo(cito)kini sudjeluju u

regulaciji osjećaja gladi (leptin i adiponektin smanjuju osjećaj gladi), regulaciji inzulinske osjetljivosti (leptin i adiponektin povećavaju osjetljivost na inzulin, a čimbenik nekroze tumora α (eng. tumor necrosis factor α , TNF α) i rezistin smanjuju) te nastanku upalnih procesa (adiponektin djeluje protuupalno, rezistin, TNF α , interleukin-6 (IL-6) i ostali citokini djeluju proupalno). Zbog lučenja citokina koji djeluju proupalno, visceralna pretilost se smatra stanjem trajne upalne aktivnosti niskog stupnja te vodi do endotelne disfunkcije i napredovanja mikroangiopatskih oboljenja u ŠB (65, 66). Među adipo(cito)kinima visceralnog masnog tkiva koje se dovodi u kontekst sa MS i ŠB odnedavno se nalazi se i dipeptidil peptidaza-4 (DPP-4), odnosno molekula CD26 (DPP-4/CD26) (67), član porodice prolin-selektivnih peptidaza.

1.6 Dipeptidil peptidaza-4

Dipeptidil peptidaza-4 (DPP-4) pripada skupini prolin-selektivnih serinskih proteaza koje sudjeluju u regulaciji različitih biokemijskih procesa u organizmu putem hidrolize N-terminalnih dipeptida s polipeptidnih i proteinskih lanaca koji na pretposljednem mjestu u primarnoj strukturi odnosno sekvenciji aminokiselina sadržavaju prolin, hidroksiprolin ili alanin (68, 69) (Slika 1.7).



Slika 1.7 Hidroliza substrata putem DPP-4

* Legenda: *Xaa* te *Yaa* označavaju prisutnost bilo koje aminokiseline. Pro-prolin, Hyp-hidroksiprolin; Ala-alanin

Nalazimo je izraženu na površini brojnih stanica tkiva različitih organa, ali i u cirkulaciji, na sistemskoj i lokalnoj razini (70) kao što je sažeto prikazano u tablici Tablici 3. Prema dosadašnjim saznanjima, uvriježena su četiri načina djelovanja DPP-4 kojima ova molekula ostvaruje svoju biološku ulogu:

- 1) Proteoliza – u svojstvu serinske proteaze, DPP-4 sudjeluje u hidrolitičkoj razgradnji pojedinih biološki aktivnih peptida, a samim time u njihovoj aktivaciji i inaktivaciji (72).
- 2) Uloga u međustaničnoj komunikaciji, komunikaciji između stanice i izvanstaničnog matriksa te međudjelovanja stanične površine i virusnih komponenata (72, 73).
- 3) Prijenos signala u stanicu – pokazano je da DPP-4 ima ulogu koreceptora u kaskadnim reakcijama prijenosa specifičnih signala kroz membranu (73-76).
- 4) Stanična proliferacija i diferencijacija, programirana stanična smrt odnosno apoptoza (77) te aktivacije limfocita T u autoimunskim procesima (71, 77, 78).

Tablica 3. Zbirni prikaz tkivne distribucije DPP-4 molekule (prema referencama 68, 69, 72)

ORGAN	TKIVO
Bubreg	proksimalni tubul glomerularni endotel epitel Bowmanove čahure
Jetra	hepatociti kanalikuli žučnog voda
Tanko crijevo	mikrovili intestinalnih kripti i resica
Gušterača	kanalikuli žučnog voda izvodni gušteračni kanal
Pluća	alveole epitel bronhiola
Žlijezde slinovnice	acinarni dio doušne žlijezde
Reproduktivni organi	maternica jajovodi lutealne stanice u jajnicima epididimis sjemena tekućina
Srce	kardiomiociti
Mišići	miociti
Limfatični organi: slezena, timus, limfni čvorovi	limfociti

Krv/serum	topivi oblik slobodne molekule limfociti
Kralježnična moždina	lamelarni mezangij
Ubikvitarna tkiva	epitel vaskularni endotel fibroblasti limfociti

Dosadašnja su istraživanja upozorila na izmijenjene vrijednosti enzimatske aktivnosti i tkivnog izražaja DPP-4 u različitim bolestima, poput upalnih bolesti crijeva, reumatoidnih, neuroloških i metaboličkih bolesti te mnogih drugih, kao što je sažeto u Tablici 4. Široki spektar bolesti u čiju patogenezu bi mogla biti uključena, čine ovu molekulu zanimljivom u kliničkom smislu kao potencijalnim, a ponegdje već i potvrđenim kandidatom za terapijsku primjenu (79-81). Istraživanja na ovom području dosada su dala već vrlo važne rezultate te naposljetku rezultirala kliničkom primjenom inhibitora DPP-4, a područje koje je u tom smislu zasigurno najistraženije jest ŠB tipa 2 (82). Naime, određeni inhibitori aktivnosti DPP-4 poput sitagliptina, saksagliptina, vildagliptina, linagliptina i alogliptina, već su u kliničkoj primjeni u smislu sprječavanja razgradnje supstrata, ponajviše inkretina, koji sudjeluju u održavanju koncentracije glukoze u krvi stalnom i pomažu u kontroli glikemije (83-86).

Tablica 4. Aktivnost serumske DPP-4 u određenim fiziološkim, odnosno patološkim stanjima (prema referencama 77-87).

Fiziološko / patološko stanje	Aktivnost serumske DPP-4/CD26
Regeneracija jetre (u štakora)	Povišena
Disfunkcija jetre (humana)	Povišena
Karcinom pankreasa i žučnih vodova (humani)	Povišen
Hepatom (humani, u štakora)	Povišena
Encefalitis (mišji)	Povišena
Odbacivanje transplantata (u štakora)	Povišena
Osteoporoza (humana)	Povišena
Upalna bolest crijeva (humana)	Snižena
Depresija (humana)	Snižena
Reumatoidni artritis (humani, u miša)	Snižena
Sistemski lupus (humani)	Snižena
Šećerna bolest (humana)	Povišena/nepromijenjena
Hipertenzija (humana)	Snižena
Trudnoća (humana)	Snižena
Neonatalna vs. odrasla dob (humana)	Snižena
Karcinom usne šupljine (humani)	Snižena
Imunosupresija (u štakora)	Snižena
Mijeloidna leukemija (humana)	Bez promjene
AIDS	Bez promjene
Fibromialgija	Bez promjene

Povišene vrijednosti aktivnosti DPP-4 nalazimo i u tipu 1 ŠB što nije iznenađujuće s obzirom da je riječ o imunološki posredovanom poremećaju metabolizma (82, 87). Paralelno sa višom enzimskom aktivnošću u serumu, u osoba sa tipom 1 ŠB istovremeno je smanjena ekspresija DPP-4 na svim subpopulacijama T limfocita čiji je poremećaj povezan s uništenjem β stanica gušterače (82) što bi moglo ukazivati na njenu moguću ulogu DPP-4 u patogenezi bolesti. S obzirom na oprečne rezultate studija koje uspoređuju aktivnost serumskog DPP4 sa glukoregulacijom, trajanjem šećerne bolesti te autoimunim biljezima (82, 87), ostaje otvoreno

pitanje značenja više serumske DPP-4 aktivnosti u osoba sa tipom 1 ŠB u usporedbi sa zdravom populacijom.

1.6.1 Dipeptidil peptidaza-4 u šećernoj bolesti

Prvotna ideja o inhibiciji aktivnosti DPP-4 u cilju liječenja ŠB tipa 2 nastala je iz saznanja omogućnosti katalitičke razgradnje inkretinskog hormona, peptida 1 sličnog glukagonu (eng. glucagon-like peptide-1; GLP-1). GLP-1 je gastrointestinalni inkretinski hormon koji se u cirkulaciju otpušta postprandijalno i potiče lučenje inzulina stimuliranog glukozom. Osim toga, ima niz drugih djelovanja u metaboličkom smislu, od odgađanja pražnjenja želuca do inhibicije lučenja glukagona, a sveukupnost njegova djelovanja pridonosi osjećaju sitosti. Nadalje, GLP-1 utječe na β -stanice gušterače potičući njihovu neogenezu i inhibirajući njihovu apoptozu te potiče biosintezu inzulina (86). Osim GLP-1, važan inkretinski hormon je i inzulintropni peptid ovisan o glukozu (eng. glucose-dependent insulintropic peptide, GIP) te niz ostalih hormona koji sudjeluju u održavanju homeostaze glukoze. Vjeruje se da sinergistično djelovanje GIP-a i GLP-1 posreduje čak 60 % do 70 % postprandijalnog lučenja inzulina (88). Međutim biološki poluživot ovih inkretina vrlo je kratak (svega 1 do 2 minute za GLP-1 te 7 minuta za GIP), jer podliježu katalitičkoj razgradnji zbog enzimskog djelovanja DPP-4, što dovodi do njihove inaktivacije (86). Stoga je niz istraživanja doveo do razvoja inhibitora DPP-4, u cilju poboljšanja metaboličke kontrole i očuvanja homeostaze glukoze u oboljelih od ŠB tipa 2 (86). Osim inkretina, DPP-4 sudjeluje u razgradnji niza drugih peptida uključenih u glukoregulaciju bilo da je riječ o peptidima koji će putem različitih receptora na gušteračnim stanicama imati utjecaj na lučenje inzulina bilo da je riječ o peptidima koji se luče iz gušterače, a imaju parakrini ili endokrini učinak (Tablica 5.) (88, 89).

Tablica 5. Substrati DPP-4 enzima koji na razini gušterače imaju utjecaj na lučenje inzulina (prema referencama 88, 89)

Receptor	Stanic a	Ligand substrat	/DPP-4	Funkcija
Glukagon-R	β (α)*	Glukagon	>> GLP-1	stimulacija sekrecije inzulina na o glukozni ovisan način
GIP-R	β (α)*	GIP	>> oksitonomodulin	stimulacija sekrecije inzulina na o glukozni ovisan način
GLP-1R	β (α)*	GLP-1	>> Glukagon	stimulacija sekrecije inzulina na o glukozni ovisan način, poticanje biosinteze inzulina, \uparrow masa β stanica, \uparrow granule inzulina
GRF-R	β (α)*	GHRH		stimulacija sekrecije inzulina i glukagona na o glukozni ovisan način
Sekretin-R	β	Sekretin		stimulacija sekrecije inzulina na o glukozni ovisan način
GRP-R	n. vagus β , (α)*	GRP		stimulacija sekrecije VIP iz neurona vagusa koji potom stimuliraju inzulinsku sekreciju
Y1-R	β	NPY		regulacija homeostaze glukoze, ponajprije regulacijom njenog unosa; inhibicija sekrecije inzulina
PRL	β	Prolaktin		stimulacija sekrecije inzulina te VIP

Legenda: >>-u manjem postotku; *manje izraženo; R-receptor; GLP-1: peptid 1 sličan glukagonu (eng. glucagon-like peptide-1; GLP-1); GIP: inzulintropni peptid ovisan o glukozni (eng. glucose-dependent insulintropic peptide, GIP); GRF-čimbenik oslobađanja hormona rasta (eng. growth hormone releasing factor; GHRH: hormon rasta (eng. growth hormone releasing hormone); GRP: čimbenik oslobađanja gastrina (eng. gastrin-releasing peptide.

GRP); NPY: neuropeptid Y (eng. neuropeptide Y); VIP: vazoaktivni intestinalni peptid (eng. vasoactive intestinal polypeptide, VIP)

Iako su prvotna istraživanja ukazivala na povišenu aktivnost DPP-4 u osoba sa tipom 2 ŠB te na njenu pozitivnu povezanost sa glukoregulacijom, visceralnim adipozitetom i pokazateljima upale (90, 91) što je koincidiralo sa početkom upotrebe DPP-4 inhibitora u kliničkoj praksi, kasnije studije dale su oprečne rezultate (92). Ubrzo je postalo jasno i da nekoliko drugih peroralnih antidijabetika kao što su metformin i pioglitazon suprimiraju aktivnost DPP-4 u serumu te da je upravo time moguće objasniti oprečne nalaze (93-95). Oba lijeka primarno ciljaju na IR, a kasnije je dokazano kako je serumska aktivnost DPP-4 viša u osoba s tipom 2 ŠB te konkomitantnom nealkoholnom masnom bolešću jetre (NAFLD, eng. non-alcoholic fatty liver disease), koja je prominentna karakteristika IR u usporedbi sa istom skupinom bolesnika bez NAFLD te zdravom populacijom (96, 90). Dodatno, DPP-4 aktivnost značajno je korelirala sa IR procijenjenom HOMA indeksom (eng. homeostasis model assessment index).

Uloga DPP-4 u patofiziologiji IR dobiva na značaju kada je identificirana njena prisutnost na površini stanica visceralnog masnog tkiva, a ujedno i povećana cirkulirajuća koncentracija u uvjetima IR (67). Eksperimentalne studije pokazale su da administracija inhibitora DPP-4 rezultira pojačanom aktivacijom PIK-3, odnosno fiziološkog puta unutarstanične inzulinske signalizacije (67) te na taj način smanjuje IR u stanicama. Dugogodišnje intervencijska istraživanja govore u prilog povoljnog učinka primjene DPP-4 inhibitora na glukoregulaciju, dislipidemiju i hipertenziju (97, 98) čija je okosnica IR, odnosno MS.

S druge strane serumska DPP-4 aktivnost i u odraslih i u adolescenata sa tipom 1 ŠB je za oko 30% viša u odnosu na zdravu populaciju (85), a izmjerenom vrijednošću od 25,91 U/L sa 75%-tnom osjetljivošću te 88%-tnom specifičnošću identificira osobe sa tipom 1 ŠB, neovisno o dobi, spolu, trajanju bolesti te glukoregulaciji (82). Više je dokaza koji govore u prilog da aktivnost ovog enzima nije u korelaciji titrom protutijela povezanih sa šećernom bolešću što implicira da je nalaz drugog značenja doli imunološki posredovanog aktivnog procesa uništenja β gušteračnih stanica. Dodatno, na eksperimentalnim modelima inzulin-deficijentnih životinja dokazan je smanjen izražaj DPP-4 molekule na površini glomerularnog endotela uz njenu povišenu serumsku aktivnost (88, 99), no točna uloga u patogenezi dijabetičke bolesti bubrega nije u potpunosti razjašnjena.

S obzirom na rastuću prevalenciju MS i IR kao njegove okosnice u tipu 1 ŠB, široki raspon DPP-4 substrata (88, 89), od kojih su neki ranije identificirani kao biljezi mikrovaskularnih komplikacija, za očekivati je da bi serumska DPP-4 aktivnost mogla biti dio složene patogeneze IR u tipu 1 ŠB, a da bi na taj način posljedično mogla doprinositi razvoju dijabetičke nefropatije, retinopatije te neuropatije što do sada nije sustavno istraživano.

2. HIPOTEZA

Viša serumska aktivnost DPP-4 povezana je sa većom IR, MS i mikrovaskularnim komplikacijama u osoba sa ŠB tipa 1.

3. CILJEVI

Opći cilj: ispitati povezanost razine aktivnosti DPP-4 u serumu s IR u osoba sa tipom 1 šećerne bolesti

Specifični ciljevi: ispitati povezanost DPP-4 aktivnosti u serumu sa:

- retinopatijom;
- dijabetičkom bolesti bubrega;
- neuropatijom;
- MS.

4. ISPITANICI I METODE

Provedeno je presječno (cross-sectional) istraživanje na jednostavnom slučajnom uzorku osoba sa tipom 1 ŠB hospitaliziranih na Zavodu za šećernu bolest Sveučilišne klinike Vuk Vrhovac, a kojima je dijagnoza postavljena na temelju kriterija SZO (4). Bolesnici su liječeni intenziviranom inzulinskom terapijom dugodjelujućim inzulinom u jednoj ili dvije dnevne doze uz ultrakratkodjelujući inzulin u tri dnevne doze prije glavnih obroka.

U istraživanje nisu uključeni bolesnici koji su imali anamnestički podatak o postojanju druge autoimune bolesti (osim ŠB tip 1), trenutnom upalnom stanju, bubrežnoj bolesti, bolesti nadbubrežne žlijezde i jetre.

Korištenjem G-power 3.1.7 programa za računanje veličine uzorka uz očekivanu standardnu devijaciju od SD 2.56 U/L za serumsku aktivnost DPP-4 (prema našoj pilot studiji, N=15) lutrijskom metodom uzorkovano je ukupno 43 ispitanika za istraživanje uz dozvoljenu pogrešku od 5% ($\alpha=0,05$), te snagu istraživanja od 80% ($1-\beta=0,8$) sa kojima je obavljen obavještajni razgovor te potpisivanje informiranog pristanka za sudjelovanje u istraživanju.

4.1. Postupci

Postupci su uključivali: uzimanje anamnestičkih podataka te obavljanje fizikalnog pregleda, uzorkovanje seruma, plazme te dva uzorka 24-satnog urina tijekom hospitalizacije, oftalmološki pregled prema standardiziranom protokolu u svrhu dijagnostike dijabetičke retinopatije (DR), neurološki pregled prema standardiziranom protokolu u svrhu dijagnostike postojanja vegetativne odnosno periferne neuropatije te mjerenje aktivnosti DPP-4 u serumu. Kreatininemija, lipidogram, HbA1c i albuminurija u 24- satnom urinu mjereni su standardnim dijagnostičkim postupcima: kreatinin u serumu (spektrofotometrija, OLYMPUS AU400), lipidogram (spektrofotometrija, OLYMPUS AU400), HbA1c u punoj krvi (imunoturbidimetrija-TINIA, COBAS INTEGRA), GAD, IA-2 (ELISA; fotometar STATFAX 2100, uzorak se smatra GAD pozitivnim ukoliko vrijednost GAD prelazi 10 U/mL, odnosno 15 U/mL za IA-2), ICA (indirektna imunofluorescencija na mikroskopu, uzorak se smatra pozitivnom ukoliko je vrijednost ≥ 5 JDF) te albuminurija u 24- satnom urinu (imunoturbidimetrija).

4.1.2 Procjena inzulinske rezistencije i dijagnoza metaboličkog sindroma

Inzulinska rezistencija procijenila se pomoću vrijednosti eGDR (eng. estimated glucose disposal rate) - indeks koji korelira s euglikemijskim hiperinzulinemijskim klamp testom, a mjeri je inzulinske osjetljivosti. Izračunava se prema formuli $24,31 - 12,2 \times OS / OB - 3,29 \times$ krvni tlak - $0,57 \times HbA1c$. Uključuje vrijednost krvnog tlaka $>140/90$ mmHg ili uzimanje antihipertenzivne terapije, a izražava se: 0-ne, 1-da. Vrijednost eGDR obrnuto korelira s IR (100). Dijagnoza MS je postavljena na temelju IDF kriterija (Tablica 2) (62).

4.1.3 Aktivnost enzima DPP-4

Kemikalije:

- Komercijalno dostupan komplet za određivanje aktivnosti enzima DPP4 (Sigma-Aldrich, SAD):
 - a. DPP-4 pufer
 - b. DPP-4 supstrat Gly-Pro-7-amino-4-metilumarin (H-Gly-Pro-AMC) – fluorogen
 - c. Pozitivna kontrola za DPP-4
 - d. AMC standard
 - e. Inhibitor DPP-4 (sitagliptin)

Instrument i dodatna oprema:

- Fluorescencijski spektrofotometar Varian Cary Eclipse (Varian, Australija)
- Mikrotitarske pločice (96 jažica)

Postupak:

Svi reagensi su otopljeni do sobne temperature i kratko su centrifugirani prije uporabe. AMC standard je pripremljen u koncentracijama $10 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ razrjeđivanjem $10 \mu\text{L}$ koncentrirane otopine s $990 \mu\text{L}$ vode. U po dvije jažice dodano je $0 \mu\text{L}$ (negativna kontrola), $2 \mu\text{L}$ (20 pmol), $4 \mu\text{L}$ (40 pmol), $6 \mu\text{L}$ (60 pmol), $8 \mu\text{L}$ (80 pmol) i $10 \mu\text{L}$ (100 pmol) pripremljene $10 \mu\text{M}$ otopine standarda. U svaku jažicu je zatim dodan DPP-4 pufer do ukupnog volumena od $100 \mu\text{L}$. U dvije jažice dodano je 1 do $2 \mu\text{L}$ DPP-4 pozitivne kontrole, a konačan volumen u

navedenim jažicama podešen je na 50 μL koristeći DPP-4 pufer. Uzorci seruma razrijeđeni su DPP-4 puferom prema potrebi kao bi se sva mjerenja nalazila unutar raspona standardne krivulje. Svi uzorci dodani su u jažice u duplikatima. Za svaki od uzoraka seruma, jedna jažica služi za mjerenje aktivnosti enzima DPP-4, a druga jažica služi kao negativna kontrola uzorka. U svaku od jažica u kojima se nalaze uzorci seruma dodano je 10 μL DPP-4 pufera ili 10 μL DPP-4 inhibitora (negativna kontrola uzorka). Uzorci na mikrotitarskoj pločici dobro su promiješani koristeći horizontalnu tresilicu. Mikrotitarska pločica je zatim omotana u aluminijsku foliju i stavljena na inkubaciju u vodenu kupelj na 37°C, 10 min. Nakon inkubacije pripremljena je reakcijska mješavina za svaki od uzoraka seruma i njihovih negativnih kontrola miješanjem 38 μL DPP-4 pufera i 2 μL DPP-4 supstrata. Navedena reakcijska mješavina nije dodana u jažice u kojima se nalaze standardi i negativna kontrola, ali je dodana u jažicama u kojima se nalazi DPP-4 pozitivna kontrola. Nakon što je u jažice dodano po 40 μL reakcijske mješavine, mikrotitarska pločica je ponovo umotana u foliju i stavljena na horizontalnu tresilicu kao bi se uzorci dobro izmješali. Ponovljena je inkubacija pločice u vodenoj kupelji na 37°C, 5 min.

Nakon 5 min inkubacije napravljeno je početno mjerenje razine fluorescencije u jažicama ($T_{\text{početno}}$). Mjerenje intenziteta fluorescencije (FLU) je napravljeno pri ekscitacijskoj valnoj duljini od 360 nm, a emisija je mjerena pri valnoj duljini od 460 nm ($\text{FLU}_{\text{početno}}$). Nakon početnog mjerenja, pločica je vraćena u kupelj na inkubaciju na 37°C, a mjerenje je ponavljano svakih 5 min sve dok vrijednost uzorka s najvećom aktivnosti enzima DPP-4 nije prešla razinu fluorescencije standarda od 100 pmol/jažici. Konačno mjerenje intenziteta fluorescencije ($\text{FLU}_{\text{konačno}}$) uzima se u vremenu inkubacije ($T_{\text{konačno}}$) prije nego što je vrijednost uzorka s najvećom aktivnosti enzima DPP-4 prešla razinu fluorescencije standarda od 100 pmol/jažici. Tijekom cjelokupne inkubacije pločica je bila zaštićena od svjetla aluminijskom folijom.

Nanošenjem vrijednosti intenziteta fluorescencije standarda na ordinatu, a koncentracija standarda na apscisu u linearnom koordinatnom sustavu dobiva se kalibracijska krivulja. S pomoću nje moguće je ovisno o očitanoj fluorescenciji ispitivanih uzoraka očitati vrijednosti otpuštenog produkta AMC.

Za svaki od uzoraka potrebno je prvo od posljednjeg mjerenja intenziteta fluorescencije $\text{FLU}_{\text{konačno}}$ oduzeti intenzitet negativne kontrole (0). Zatim je za svaki od uzoraka potrebno izračunati promjenu u intenzitetu fluorescencije (ΔFLU) od početnog do konačnog vremena inkubacije prema formuli:

$$\Delta\text{FLU} = \text{FLU}_{\text{konačno}} - \text{FLU}_{\text{početno}}$$

Od dobivene vrijednosti ΔFLU za svaki uzorak potrebno je oduzeti i ΔFLU vrijednost koja se odnosi na razliku intenziteta fluorescencije negativne kontrole samog uzorka. Na temelju ΔFLU vrijednosti iz standardne krivulje određuje se vrijednosti otpuštenog produkta AMC (B), a aktivnost enzima DPP-4 određuje se prema formuli:

4.1.4 Procjena bubrežne funkcije

Postojanje dijabetičke nefropatije se procijenilo na temelju vrijednosti kreatinskog klirensa iz seruma, pomoću CKD EPI formule, te albumina u 24-h urinu. Formula CKD EPI glasi: $141 \times \min(\text{Scr}/\kappa, 1)^\alpha \times \max(\text{Scr}/\kappa, 1)^{-1,209} \times 0,993^{\text{Dob}} \times 1,018$ [ako žensko] (101). Skr označava kreatinin u serumu (mg/dL), $\kappa=0,7$ za žene i $0,9$ za muškarce, $\alpha=-0,329$ za žene i $-0,411$ za muškarce, min ukazuje na minimum od Scr/κ ili 1 , a max ukazuje na maksimum od Scr/κ ili 1 .

4.1.5 Dijabetička retinopatija

Ispitivanje postojanja dijabetičke retinopatije se provodilo u specijaliziranoj oftalmološkoj ambulanti pomoću standardiziranog protokola.

Vidna oštrina (VO, centralna vidna oštrina; lat. visus oculi) s najboljom korekcijom, ispitana je pomoću standardnih optotipa na udaljenosti od 6 metara (Snellenovi optotipi brojevi i optotipi slova), a izražena razlomkom i dekadskim sustavom, pri čemu $6/6 = 1,0$ označava normalnu vidnu oštrinu. Slabovidnost (lat. amblyopia) se prema vidnoj oštrini definira kao blaga: VO $0,8 - 0,4$, srednja: VO $0,3 - 0,1$ i teška slabovidnost: VO $< 0,1$ (102). Intraokularni tlak (IOT) mjerio se, nakon ukapavanja kapi lokalnog anestetika ($0,4\%$ novesina) i fluoresceina ($0,5\%$ fluorescein-Na), Goldmann aplanacijskim tonometrom (eng. Goldmann applanation tonometer; GAT). Prema smjernicama Europskog glaukomskeg društva raspon normalnog očnog tlaka u odraslih osoba je između 10 i 21 mmHg (103). Pregled prednjeg segmenta oka obavljao se na biomikroskopu s procjepnom svjetiljkom (Topcon). Binokularni pregled očne pozadine, nakon ukapavanja midrijatičkih kapi ($0,5\%$ tropikamid i 5% fenilefrin), obavljao će se na istom biomikroskopu indirektnom oftalmoskopijom pomoću nekontaktnih leća (VOLK SuperField NC® i VOLK Super 66®) (104). Nakon pregleda u midrijazi, slikana je očna pozadina oba oka na digitalnoj fundus kameri (Zeiss, VISUCAM) -

45° retinalna kolor fotografija dva standardna polja (makularno polje i disk/nazalno polje). Makularno polje - pozicionirano tako da se PNO nalazi na horizontalnom meridijanu nazalnog ruba slike. Disk/nazalno polje - pozicionirano tako da se PNO nalazi na horizontalnom meridijanu 1 DD udaljena od temporalnog ruba slike. Promjene na očnoj pozadini analizirane na osnovi retinalnih kolor fotografija, a stupanj retinopatije odredio se prema EURODIAB standardu (105). Nalaz lošijeg oka odredio je stupanj retinopatije na temelju kojeg su ispitanici bili podijeljeni u tri ispitivane skupine.

Skupina 1 obuhvaćala je ispitanike koji nisu imali znakove dijabetičke retinopatije.

Skupina 2 obuhvaćala je ispitanike s blagom i/ili umjereno teškom neproliferativnom dijabetičkom retinopatijom (NPDR).

Skupina 3 obuhvaćala je ispitanike s teškom/vrlo teškom NPDR i proliferativnom dijabetičkom retinopatijom (PDR) ili stanjem nakon prethodno učinjene laserske fotokoagulacije retine (ALFKG) i/ili intravitrealno liječenje triamcinolonom ili bevacizumabom.

4.1.6 Dijabetička neuropatija

Postojanje dijabetičke neuropatije se provodilo u specijaliziranoj neurološkoj ambulanti pomoću standardiziranog protokola. S obzirom na zahvaćeni dio živčanog sustava dijabetičke neuropatije smo podijelili prema Dycku (106) na simetričnu neuropatiju (distalna senzorna ili senzomotorička polineuropatija, autonomna neuropatija, inzulinski neuritis), fokalnu i multifokalnu neuropatiju (neuropatije kranijalnih živaca, trunkalna radikuloneuropatija, proksimalna neuropatija, kompresivne neuropatije) te kombiniranu neuropatiju. Dijabetička polineuropatija (DPN) je podijeljena na 3 skupine. Skupina 1 obuhvaćala je ispitanike koji nisu imali znakove dijabetičke polineuropatije. Skupina 2 obuhvaćala je ispitanike s početnom ili prvim stupnjem dijabetičke polineuropatije. Skupina 3 obuhvaćala je ispitanike s drugim stupnjem dijabetičke polineuropatije.

1. *Neurološki pregled* provodio se standardiziranim postupkom sukladno neuropatskom bodovnom sustavu (eng. Neuropathy Impairment Score, NIS) za donje udove (107). Tijekom pregleda ispitivali su se osjet dodira, boli, vibracije i položaja, miotatski refleksi (m. quadriceps femoris i m. triceps surae) te ocjenjivala mišićna snaga donjih udova.

- a) Mišićna snaga ispitivala se obostrano pri sljedećim pokretima: fleksija i ekstenzija koljena, dorzifleksija stopala, plantarna ekstenzija stopala te fleksija i ekstenzija nožnih prstiju. Snaga je ocijenjena kao: 0 – uredna, 1 – 25% slabija, 2 – 50% slabija, 3 – 75% slabija, 3,25 – pokret protiv gravitacije, 3,5 pokret pri eliminiranoj gravitaciji, 3,75 mišićna kontrakcija bez pokreta, 4 – paraliza.
- b) Miotatski refleksi su se ispitivali obostrano te je svaki ocijenjen kao: 0 – uredan, 1 – oslabljen, 2- odsutan.
- c) Osjet je ispitivan u ležećem položaju, zatvorenih očiju ispitanika, podraživanjem kože neposredno ispod nokta (distalna falanga) obaju nožnih palaca. Osjet dodira provociralo se laganim dodirom pomoću smotuljka vate, nepravilnim slijedom, pri čemu su ispitanici odgovarali osjećaju li dodir ili ne. Osjet bola ispitivan je pribadačom s jednim zaobljenim vrhom. Naizmjeničnim podražajem iglenog ili zaobljenog dijela ispitanici su odgovarali je li dodir tup ili oštar. Osjet vibracije ispitivan je zatitralom vibracijskom vilicom frekvencije 128 Hz prislonjenom na gore navedno područje stopala. Ispitanici su trebali odrediti trenutak kada više ne osjećaju vibraciju. Usporedbom vibracije ispitanika i ispitivača dobiven je podatak o urednoj, skraćenoj ili odsutnoj vibraciji. Osjet položaja se ispitivao pomicanjem distalne falange palca pri čemu su ispitanici odgovarali osjećaju li pomak i u kojem smjeru. Sve navedene vrste osjeta ocjenjivane su kao: 0 – uredan, 1 – oslabljen, 2 – odsutan osjet. Zbrojene ocjene dobivene ispitivanjem mišićne snage, refleksa i osjeta činile su NIS.

2. *Elektroneurografija*- brzina motorne provodljivosti i visina amplitude M potencijala za n. peroneus i n. tibialis te brzina senzorne provodljivosti i visina amplitude neuralnog potencijala za n. suralis procijenjene su površinskim stimulacijskim i registracijskim elektrodama na oba donja ekstremiteta. Pri testiranju je korišten Dantec Keypoint standardni EMNG uređaj (Dantec Co, Skovlunde, Danska). Testiranje se provodilo pri temperaturi kože stopala iznad 30°C. Mjesta stimulacije i registracije su određena standardnom procedurom (108). Provodljivost motornih vlakana ispitivana je stimulacijom perifernog živca pomoću površinske elektrode (supramaksimalnom jačinom struje i trajanja 0,1 msec) postavljene iznad živca, čime se izazvala depolarizacija membrane živčanog vlakna. Nastali akcijski potencijal potom putuje duž živca, a dobiveni mišićni evocirani odgovor (M potencijal) registriran je na monitoru pomoću površinske elektrode postavljenje nad odgovarajućim mišićem. Senzorna brzina provodljivosti n. suralisa u proksimalnom segmentu (distalni dio potkoljenice) mjerena je antidromno. Provodljivost senzoričkih vlakana ispitana je stimulacijom n. suralisa površinskom stimulacijskom elektrodom (strujom od 20 do 40 mA i trajanja 0,1 msec) postavljenom iznad živca. Površinska registracijska elektroda postavljena distalnije nad istim

živcem bilježila je evocirani živčani odgovor. Amplituda dobivenog M i živčanog potencijala mjerena je u mV od osnovne crte do vrha negativne faze. Brzina motorne i senzoričke provodljivosti izračunata je iz dobivene latencije (vrijeme proteklo od trenutka podražaja do pojave evociranog potencijala) i udaljenosti elektroda, a izražena je u m/s. Dobivene vrijednosti uspoređene su s normalnima, koje ovise o vrsti ispitivanog živca, visini ispitanika te temperaturi ekstremiteta. Za statističku obradu korišteni su podaci dobiveni ispitivanjem noge s većom amplitudom n. suralisa.

3. Testiranje *autonomnog živčanog sustava* provedeno je na aparatu VAGUS 2100 (Sigma Medizin Technik, Thum, Njemačka) korištenjem standardne baterije srčanožilnih testova. Testiranje autonomnog živčanog sustava provedeno je na aparatu VAGUS 2100 (Sigma Medizin Technik, Thum, Njemačka) korištenjem standardne baterije kardiovaskularnih testova u mirnoj prostoriji, bez prekidanja, uz prethodnu edukaciju bolesnika o načinu provođenja testova. Uvjeti testiranja sustandardizirani (testiranje se provodilo između 9-12 sati ujutro, najmanje 2 sata nakon laganog doručka, a ispitanik na dan testiranja ne konzumira kavu, crni čaj niti puši, prije testiranja provjerava se glikemija). Tri jednokratne, samoljepljive EKG elektrode apliciraju se na prsni koš ispitanika te se pomoću samoljepljive trake postavi senzor za disanje. Standardnu bateriju kardiovaskularnih testova za potvrdu dijabetičke autonomne neuropatije čine: test mirovanja, test dubokog disanja, Valsalvin test, aktivni ortostatski test, te ortostatski test krvnog tlaka. Kompjuterizirani sustav na temelju rezultata mjerenja izračunava slijedeće parametre: koeficijent varijacije R-R intervala u mirovanju, spektar vrlo niske frekvencije, niske frekvencije i visoke frekvencije u spektralnoj analizi, koeficijent varijacije R-R intervala tijekom dubokog disanja, E/I omjer, 30:15 omjer i Valsalva omjer. Patološki nalaz više od jednog parametra smatra se dovoljnim za postavljanje dijagnoze autonomne dijabetičke neuropatije (109).

4.2 Statistička raščlamba podataka

Statistička raščlamba podataka vršena je pomoću Statistica (verzija 10) kompjutorskog programa, postupcima ispitivanja razlika i povezanosti. Normalnost raspodjele ispitana je Shapiro-Wilk testom. Prosječne vrijednosti numeričkih podataka prikazane su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom za varijable koje se normalno raspodjeljuju, a medijanom i rasponom za varijable koje nemaju normalnu raspodjelu. Nominalni pokazatelji prikazani su učestalošću i postotkom. Razlike između dva nezavisna uzorka ispitane su pomoću Studentovog t-testa u parametrijskoj statistici, a pomoću Mann-Whitneyevog testa u neparametrijskoj statistici. Razliku između više od dva nezavisna uzorka ispitane su ANOVA testom za parametrijsku (s post hoc Scheffeovim testom), a Kruskal-Wallis testom za neparametrijsku statistiku (s post hoc Mann-Whitneyevim testom). Razlike u nominalnim pokazateljima (proporcijama) između dva uzorka ispitane su pomoću χ^2 testa (i Fisherovog egzaktnog testa) i omjera rizika s 95% intervalom pouzdanosti. Razlike u nominalnim pokazateljima između više od dva uzorka ispitane su pomoću χ^2 testa. Korelacije su ispitane pomoću parametrijskog Pearsonovog testa korelacije koeficijenta korelacije. U slučaju statistički značajnih linearnih korelacija odnos je prikazan linearnom regresijskom analizom. Prediktorne varijable su testirane multivarijatnom raščlambom pomoću binarne logističke regresije- Hosmer-Leveshow goodness-of-fit test. Odredio se odnos prevalencija (OP, eng. *prevalence ratio*) s 95% granicama pouzdanosti (CI, eng. *confidence intervals*).

4.3 Etička načela

Ovo istraživanje odobrilo je Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice Merkur te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje je provedeno u skladu sa svim primjenjivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje su sudjelovale u ovom znanstvenom istraživanju uključuju i Osnove dobre kliničke prakse, Helsinšku deklaraciju, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske i Zakon o pravima pacijenata Republike Hrvatske.

5. REZULTATI

5.1 Opća, klinička i laboratorijska obilježja svih ispitanika

Regrutirana su ukupno 43 ispitanika dobi 46 ± 13 godina prosječnog trajanja ŠB tip 1 $24,5$ ($10-47$) godina. Dvadeset osam ($65,1$ %) ih je bilo muškog spola. Njihova antropometrijska, klinička i laboratorijska obilježja prikazana su u Tablici 6.

Svi ispitanici imali su uredan hormonski status štitne žlijezde kako slijedi: TSH $2,61 \pm 1,62$ mU/L, slobodni triiodtironin (fT3) $5,5 \pm 1,4$ pmol/L i slobodni tetraiodtrionin (fT4) $15,15 \pm 2,76$ pmol/L; te vrijednosti C reaktivnog proteina (CRP) unutar normalnog raspona $1,1$ ($0,1-5,2$) mg/L. Trideset dva ispitanika ($74,42\%$) ispitanika imala su pozitivna GAD i IA2 autoantitijela, 7 ($16,28\%$) GAD i ICA, a 4 ($9,3\%$) samo ICA autoantitijela. Vrijednost titra GAD autoantitijela bila je $466,6 \pm 37,81$ U/mL; ICA $25,8 \pm 5,4$ JDF, a IA-2 $257,4 \pm 15,42$ U/mL. Dvadeset devet ($67,44$ %) ispitanika imalo je dijagnosticiranu arterijsku hipertenziju, 23 ($53,49\%$) su uz inzulin u medikamentoznoj terapiji imali ACEI, a 22 ($51,16$ %) hipolipemik. Metabolički sindrom bio je prisutan u njih 20 ($46,5$ %). Neoproliferativna DR utvrđena je u 20 ($46,5\%$) osoba, a PDR u 9 ($20,9\%$).

Prvi stupanj periferne neuropatije utvrđen je u 15 ($34,9\%$), a drugi u 21 ($48,8\%$) ispitanika, dok je autonomna neuropatija dijagnosticirana u njih 19 ($44,19\%$). Dijabetička bolest bubrega u ispitanika bila najmanje učestala komplikacija; prisutna u 8 osoba ($18,6\%$).

Tablica 6. Antropometrijska, klinička i laboratorijska obilježja ispitanika

Opseg struka (cm);	
-osobe ženskog spola	79,13±5,44
-osobe muškog spola	94,36±8,99
ITM (kg/m ²)	25,8±2,9
Puls (otkucaj/minuta)	74,7±16,5
Sistolički krvni tlak(mmHg)	120 (105-165)
Dijastolički krvni tlak (mmHg)	80 (70-100)
HbA1c (%)	7,4±1,2
Serumski kreatinin (mg/dL)	72 (41-224)
eGFR (mL/min/1.73m ²)	105 (27-130)
Kolesterol (mmol/L)	4,95±0,81
HDL kolesterol (mmol/L)	1,58±0,28
-osobe ženskog spola	1,73±0,78
-osobe muškog spola	1,51±0,23
LDL kolesterol (mmol/L)	2,82±0,81
VLDL kolesterol (mmol/L)	0,53±0,22
Trigliceridi (mmol/L)	1,16±0,47
Albumini dU (mg/24h)	7,0 (3,36-833,0)
eGDR (mgKg ⁻¹ min ⁻¹)	6,79 (3,72-11,36)
DPP-4 aktivnost (U/L)	32,52 (20,80-39,92)

Legenda: ITM-indeks tjelesne mase; eGFR-procijenjena glomerulerna filtracija (eng. *estimated glomerular filtration rate*); eGDR-procijenjena vrijednost raspoloživosti glukoze (eng. *estimated glucose disposal rate*)

5.2 Podjela ispitanika prema medijanu DPP-4 aktivnosti

Prema medijanu DPP-4 aktivnosti od 32,52 U/L, ispitanici su podijeljeni u dvije skupine: 22 (51,16%) ih je imalo izmjerenu DPP-4 aktivnost ispod navedene, a 21 (48,84 %) iznad. U skupini ispitanika sa DPP-4 aktivnošću <32,52 U/L bilo je 14 (63,6%) muškaraca, a u skupini sa višom DPP-4 aktivnošću isti broj (66,7%), što se nije pokazalo statistički značajnim ($p=0,545$). Više muških ispitanika u skupini sa višom DPP-4 aktivnošću u terapiji je imalo hipolipemik (N, %, 12, 85,7%) naspram osoba ženskog spola (N, %, 3, 43,86%), $p=0,002$. Antropometrijska, klinička i laboratorijska kao i razlike između obilježja od interesa navedena su u Tablici 7.

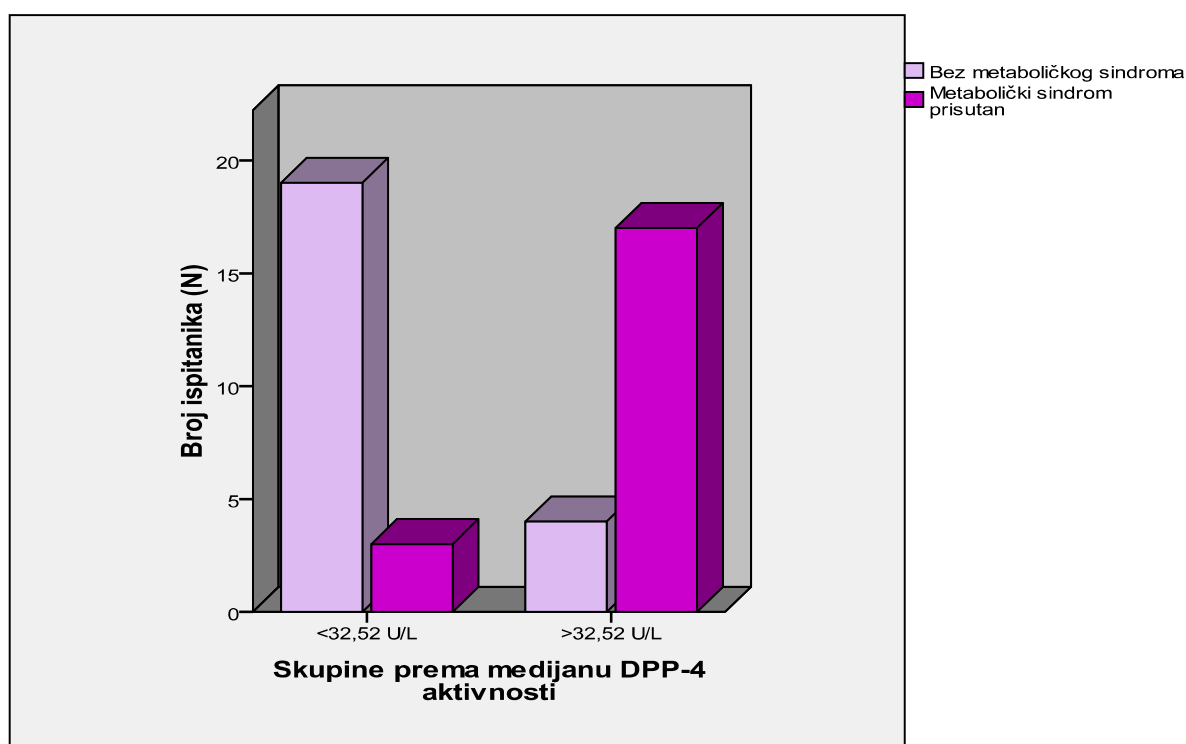
Tablica 7. Antropometrijska, klinička i laboratorijska obilježja ispitanika podijeljenih prema medijanu DPP-4 aktivnosti

	Skupina sa DPP-4 aktivnošću <32,52 U/L N=22	Skupina sa DPP-4 aktivnošću >32,52 U/L N=21	p
Dob (godine)	42 (23-65)	52 (21-63)	0,001
Trajanje bolesti (godine)	22 (10-41)	28 (17-47)	0,004
Opseg struka (cm);			
-osobe ženskog spola	74,14±4,98	81,75±11,39	0,042
-osobe muškog spola	93,79±8,75	94,39±9,53	0,744
ITM (kg/m ²)	25,5±3,1	26,0±2,9	0,605
Puls (otkucaj/minuta)	71,95±16,98	77,57±15,89	0,270
Sistolički krvni tlak(mmHg)	120 (105-160)	130 (110-165)	0,038
Dijastolički krvni tlak (mmHg)	80 (70-90)	80 (70-100)	0,121
HbA1c (%)	7,4±1,1	7,5±1,4	0,787
Dnevna doza inzulina (U/kg)	0,52±0,07	0,65±0,09	0,004
Serumski kreatinin (mg/dL)	68,2 (50-102)	74 (41-224)	0,381
eGFR (mL/min/1.73m ²)	110,5 (62-129)	101 (27-130)	0,049
Kolesterol (mmol/L)	4,63±0,69	5,0±0,91	0,677
HDL kolesterol (mmol/L)		1,52±0,30	0,847
-osobe ženskog spola	1,73±0,24	1,66±0,38	0,805
-osobe muškog spola	1,51±0,23	1,47±0,19	0,421
LDL kolesterol (mmol/L)	2,82±0,68	2,83±0,92	0,874
VLDL kolesterol (mmol/L)	0,51±0,19	0,56±0,23	0,457
Trigliceridi (mmol/L)	1,12±0,43	1,21±0,52	0,500
Albumini dU (mg/24h)	7,0 (3,36-113,80)	8,42 (4,59-833,0)	0,251
eGDR (mgKg ⁻¹ min ⁻¹)	9,22 (5,12-11,36)	6,27 (3,72-8,38)	0,004
DPP-4 aktivnost (U/L)	25,4 (20,80-32,52)	36,50 (35,52-39,92)	-----

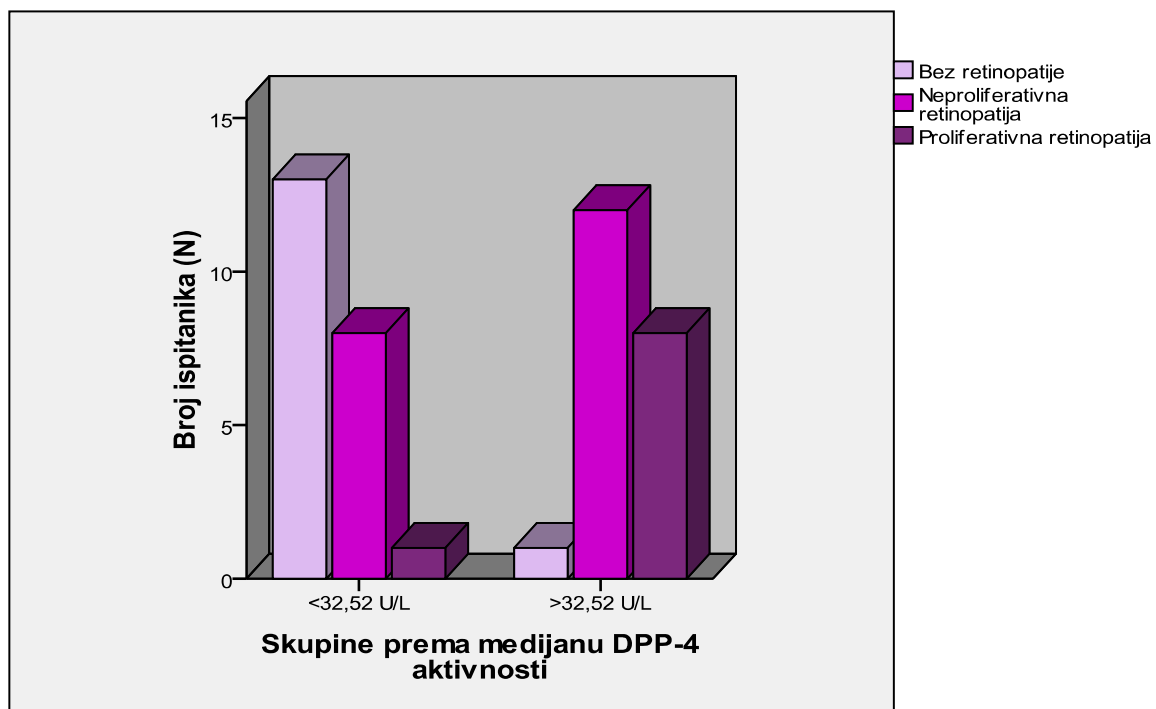
Legenda: ITM-indeks tjelesne mase; eGFR-procijenjena glomerularna filtracija (eng. *estimated glomerular filtration rate*); eGDR-procijenjena stopa raspoloživosti glukoze (eng. *estimated glucose disposal rate*)

Metabolički sindrom bio je priustan u značajno većeg broja ispitanika u skupini sa višom u odnosu na skupinu sa nižom DPP-4 aktivnošću (17 (81%) vs 3 (13,6%), $p < 0,001$, Fischerov egzaktni test). Neproliferativnu DR imalo je 12 (57,1%), a proliferativnu DR 8 (38,1%) ispitanika u skupini sa višom DPP-4 aktivnošću naspram 8 (36,4%) odnosno 1 (4,5%) u skupini sa nižom enzimatskom aktivnošću ($p < 0,001$, χ^2 test). Ukupan broj slučajeva dijagnosticirane periferne DN bio je viši u skupini ispitanika sa DPP-4 $> 32,52$ U/L, međutim, kao i ukupan broj težeg stupnja DN. Naime, stupanj/gradus I DN bio je prisutan u 6 (28,6%) naspram 9(40,9%) odnosno za stupanj/gradus II: 13 (61,9%) naspram 8(36,4%), $p = 0,089$ te 0,085 za redosljed navođenja, χ^2 test. Učestalost autonomne neuropatije bila je značajno viša u skupini sa višom DPP-4 aktivnošću (15(71,4%) naspram 4(18,2%), $p = 0,001$, Fischerov egzaktni test), kao i dijabetička bolest bubrega (nefropatija) (6 (28,6%) naspram 2 (9,1%), $p = 0,021$, Fischerov egzaktni test) (grafovi 1-5.).

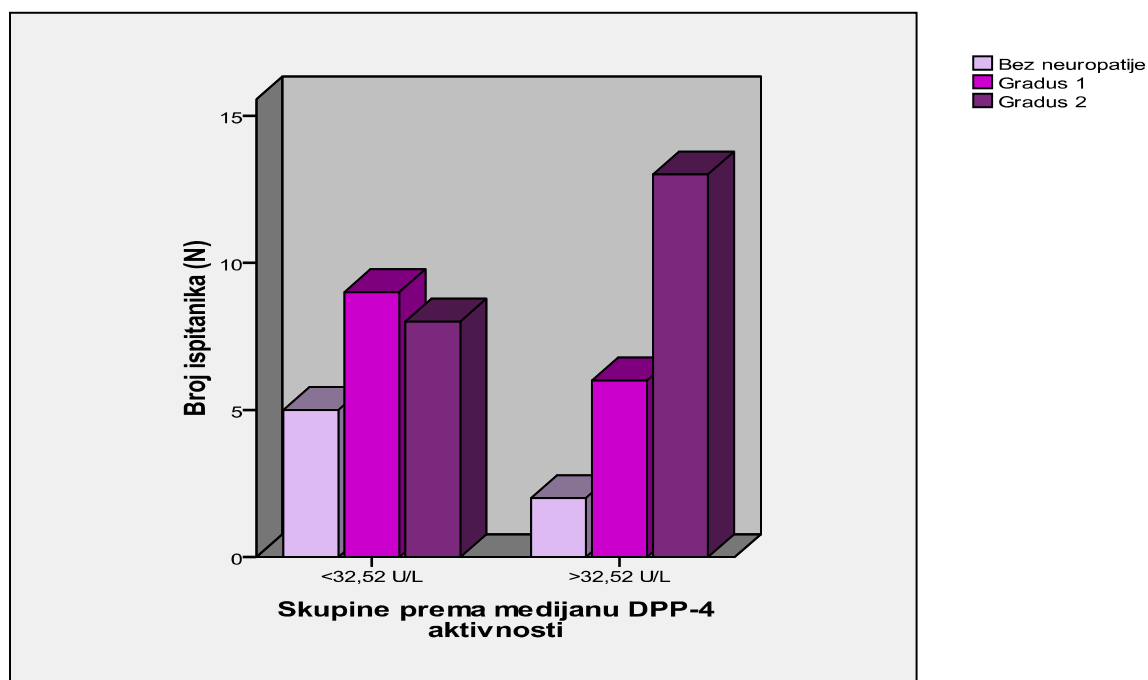
Graf 1. Prisutnost MS u ispitanika podijeljenih prema medijanu DPP-4 aktivnosti



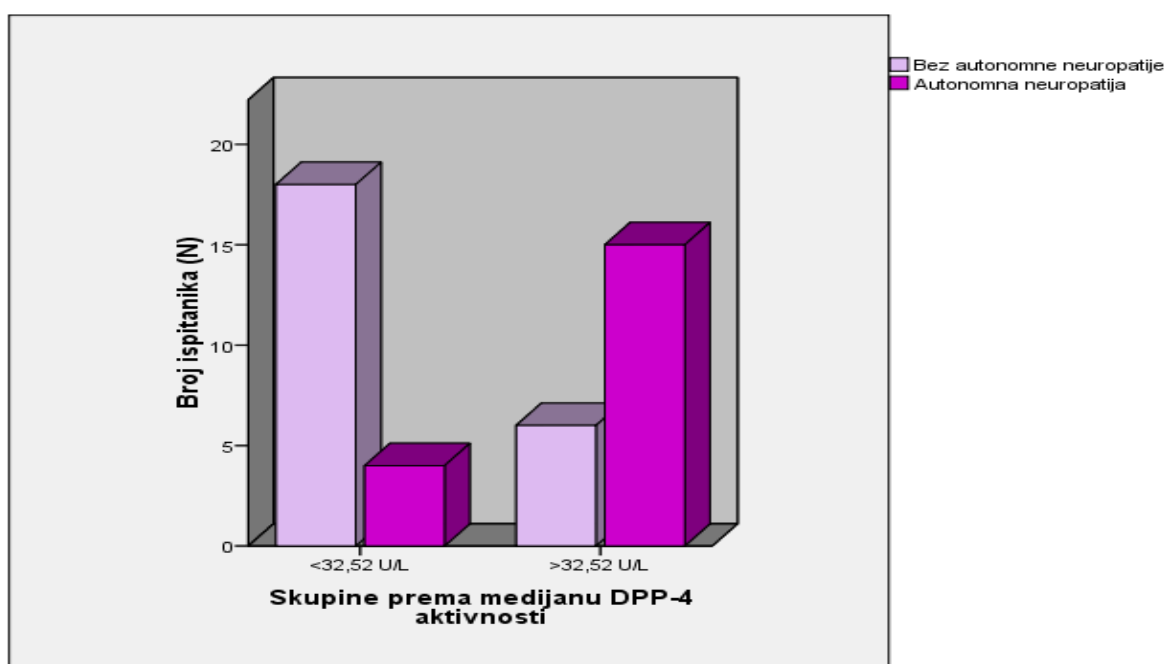
Graf 2. Prisutnost DR prema stupnjevima u ispitanika podijeljenih prema medijanu DPP-4 aktivnosti



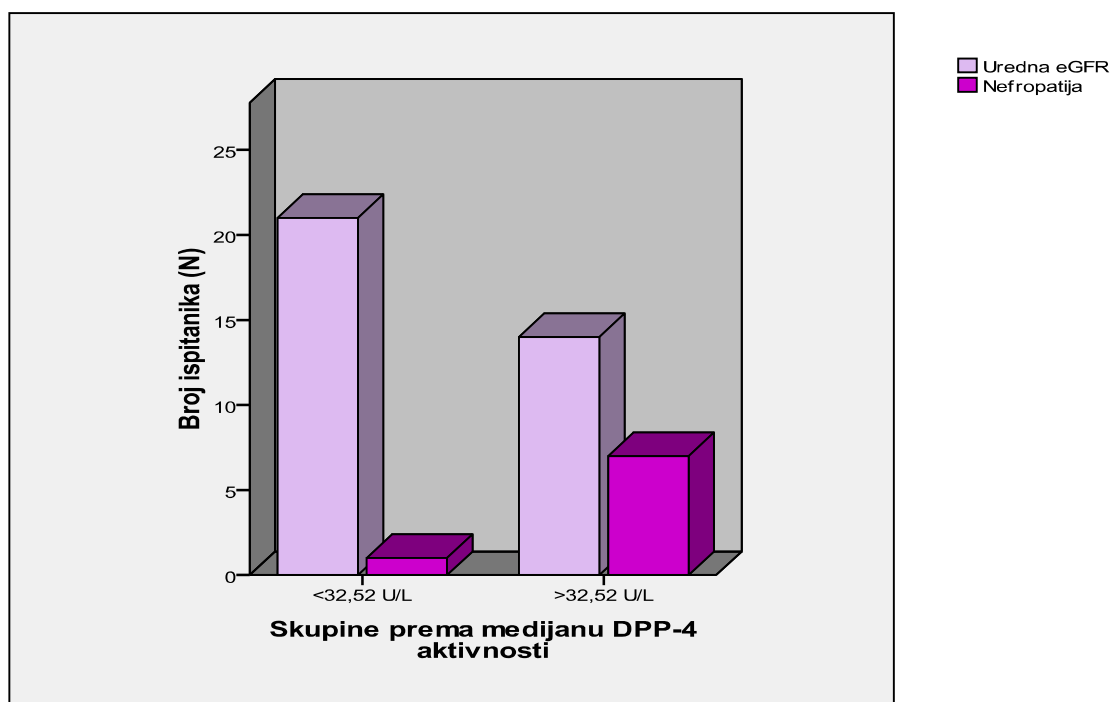
Graf 3. Prisutnost periferne neuropatije prema supnjevim u ispitanika podijeljenih prema medijanu DPP-4 aktivnosti



Graf 4. Prisutnost autonomne neuropatije u ispitanika podijeljenih prema medijanu vrijednosti DPP-4 aktivnosti



Graf 5. Prisutnost dijabetičke bolesti bubrega u ispitanika podijeljenih prema medijanu vrijednosti DPP-4 aktivnosti



U pogledu konkomitantne medikamentozne terapije, veći broj ispitanika iz skupine sa višom DPP-4 aktivnošću koristio je ACEI (14 (66,7%) naspram 9 (40,9%) u skupini sa DPP-4 aktivnošću nižom od 32,52 U/L, $p=0,082$, Fischerov egzaktни test) kao i hipolipemike (17 (81% naspram 5(22,7%), $p<0,001$, Fischerov egzaktни test).

5.3 Korelacije i linearna logistička regresija

Serumska aktivnost DPP-4 pokazala je značajnu pozitivnu korelaciju sa trajanjem ŠB ($r=0,464$, $p=0,003$, Pearsonov test korelacije), ipak, nije se našlo značajne korelacije između titrova GAD, ICA ni IA-2 autoantitijela sa DPP-4 aktivnošću (Tablica 7.).

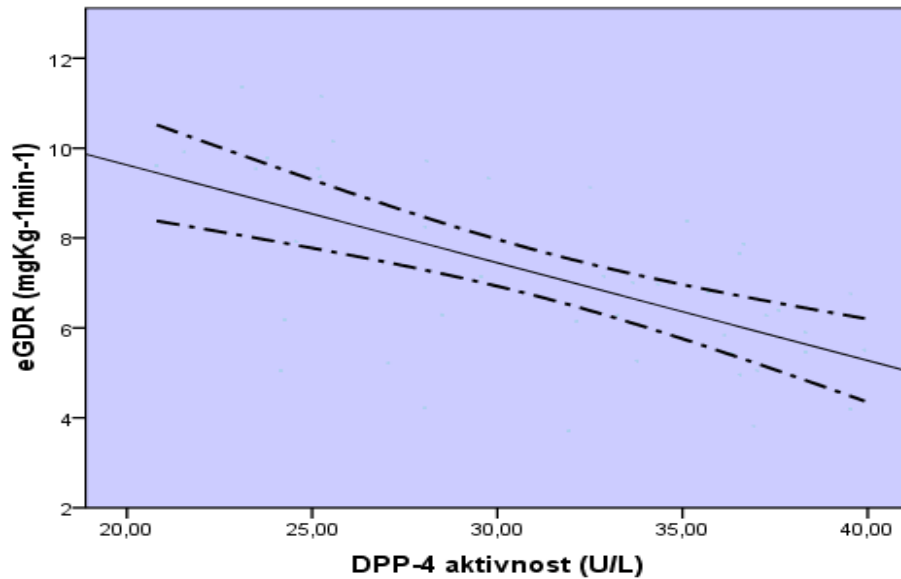
Tablica 7. Pearsonov korelacijski test titra autoantitijela i DPP-4 aktivnosti

Varijabla	DPP-4 aktivnost (U/L)
ICA (JDF)	$r=0,080$; $p=0,509$
GAD (U/mL)	$r=0,093$; $p=0,448$
IA-2 (U/mL)	$r=0,152$; $p=0,241$

U linearnoj regresiji prilagođenoj za dob i spol ispitanika, kao i HbA1c vrijednost te konkomitantnu medikamentoznu terapiju značajnost se izgubila ($B=0,201$, $(-0,008-0,410)$, $p=0,059$). Iako je opseg struka u žena sa nižom DPP-4 aktivnošću bio značajno niži u odnosu na žene sa iz skupine sa višom aktivnošću, DPP-4 aktivnost nije značajno korelirala sa opsegom struka ($r=0,314$, $p=0,249$; Pearsonov korelacijski test).

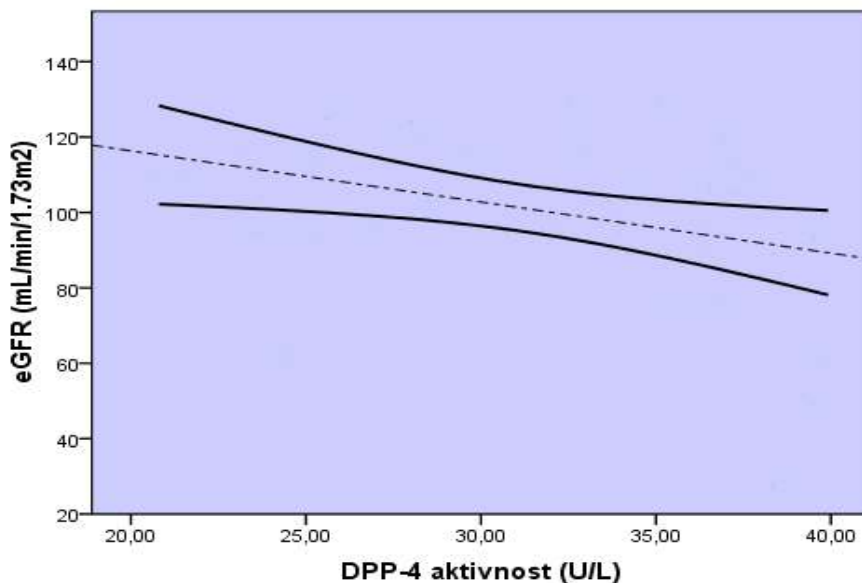
DPP-4 aktivnost značajno je negativno korelirala sa procijenjenom inzulinskom osjetljivošću ($r=-0,609$, $p<0,001$, Pearsonov test). Dodatno, pokazalo se da za svaki porast aktivnosti DPP-4 od 1 U/L, eGDR opada za $0,218 \text{ mgKg}^{-1}\text{min}^{-1}$ (uz 95% interval pouzdanosti $-0,307-(-0,128)$, $p<0,001$; linearna regresijska analiza prilagođena za dob, spol, HbA1c i trajanje bolesti ispitanika, konkomitantnu medikamentoznu terapiju te eGFR (Graf 6.).

Graf 6. Linearna regresija za DPP-4 aktivnost i eGDR prilagođena za dob, spol, HbA1c i trajanje bolesti, eGFR te upotrebu ACEI i hipolipemika



Aktivnost DPP-4 negativno je korelirala sa procijenjenom bubrežnom filtracijom $r=-0,366$, $p=0,016$, Pearsonov test korelacije. U linernoj regresijskoj analizi prilagođenoj za dob, spol, HbA1c i trajanje bolesti, eGDR te konkomitantnu medikamentoznu terapiju (ACEI te statine) pokazalo se da za svaki porast DPP-4 aktivnosti od 1 U/L, eGFR opada za 1,49 mL/min/1.73m², uz 95%-tni interval pouzdanosti -2,69-(-0,303), $p=0,016$, Graf 7.

Graf 7. Linearna regresija za DPP-4 aktivnost i eGFR prilagođena za dob, spol, HbA1c, trajanje bolesti, eGDR te upotrebu ACEI i hipolipemika



Vrijednost sistoličkog krvnog tlaka također je pozitivno korelirala sa DPP-4 aktivnošću ($\rho=0,418$, $p<0,005$, Spearmanov test), a linearna regresijska analiza prilagođena za dob, spol, HbA1c, trajanje bolesti, eGDR, eGFR te upotrebu ACEI i hipolipemika pokazala je da vrijednost sistoličkog krvnog tlaka raste za 1,157 mmHg za svaku jedinicu porasta DPP-4 aktivnosti (95%-tni interval pouzdanosti (CI, eng. *confidence interval*) 0,242-2,072, $p=0,015$).

5.4 Binarna logistička regresija

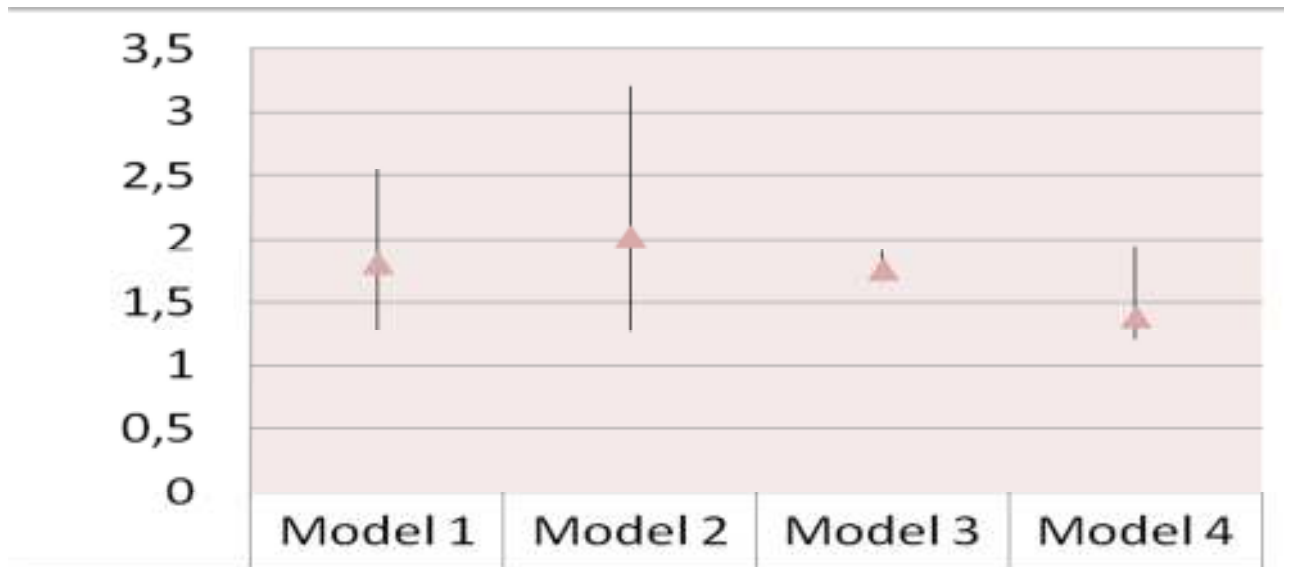
Kako su prisutnost MS, autonomne neuropatije te DR (PR+NPDR) bili značajno viši u skupini ispitanika sa višom serumskom aktivnošću DPP-4, povezanost enzimske aktivnosti prilagođene za varijable koje su dosegle statistički značajnu razliku u univarijatnoj analizi i/ili literaturno dokazano pokazuju povezanost sa promatranom sa MS, autonomnom neuropatijom i DR testirana je binarnom logističkom regresijom u četiri različita računaska modela.

Izmjerena vrijednost serumске aktivnosti DPP-4 pokazala je pozitivnu povezanost s MS (OP 1,801; 95% CI 1,272-2,550) koja je zadržala statističku značajnost nakon prilagodbe za dob, spol i trajanje ŠB (OP 2,018; 95% CI 1,268-3,124), a potom dodatno i za izračunatu eGFR (OP 1,755; 95%CI 1,773-1,899) kao i upotrebu ACEI i hipolipemika (OP 1,392; 95% CI 1,206-1,941); Graf 8.

S obzirom da broj ispitanika koji su imali NPDR odnosno PDR gledan zasebno ne zadovoljava uvjete za logističku regresiju, a da je NPDR predstadij DR, da bi se ispitala povezanost DPP-4 aktivnosti sa retinopatijom, ispitanici sa BPDR te PDR sačinjavali su jednu skupinu, odnosno jednu dihotomnu varijablu-prisutnost DR (da/ne). Neprilagođena vrijednost serumске aktivnosti DPP-4 pokazala je pozitivnu povezanost sa DR (OP 1,316; 95% CI 1,095-1,581) koja je ostala statistički značajna nakon prilagodbe za dob, spol i trajanje ŠB (OP 1,349; 95% CI 1,105-1,647), a potom dodatno i za izračunatu eGFR te albuminuriju (OP 1,388; 95%CI 1,089-1,645) kao i upotrebu ACEI (OP 1,413; 95% CI 1,103-1,811); Graf 9.

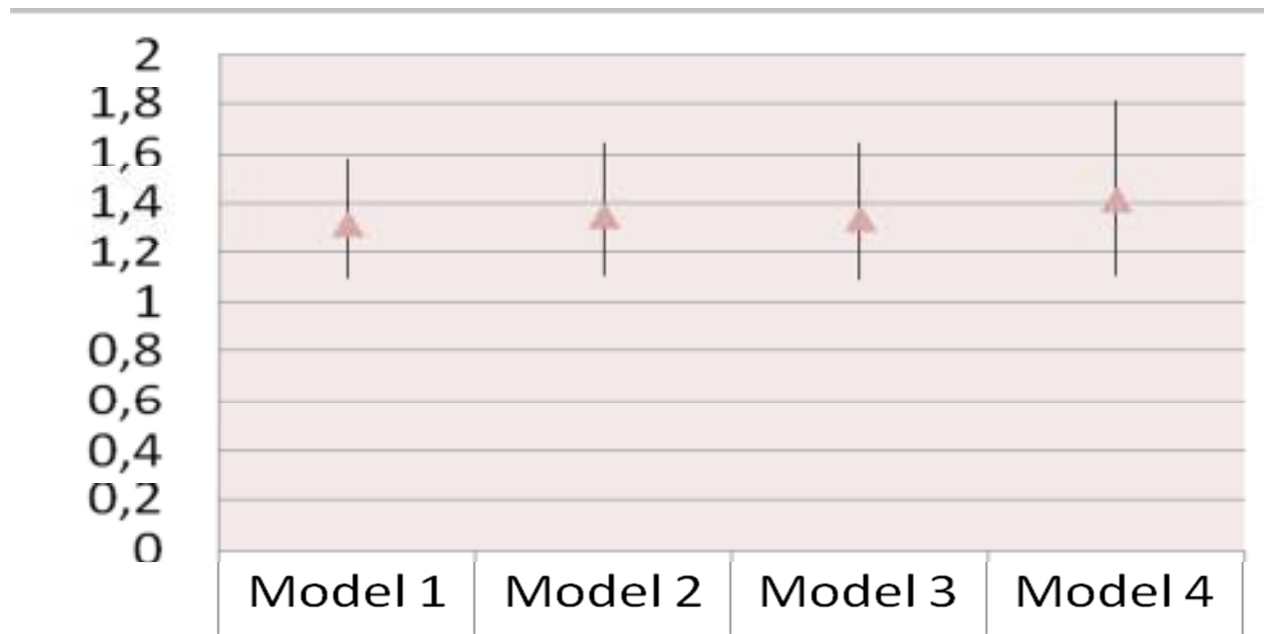
Završno, pozitivna povezanost neprilagođene DPP-4 aktivnosti sa prisutnošću autonomne neuropatije (OP 1,349; 95%CI 1,124-1,620) nije se značajno promijenila ni modifikacijom za dob, spol i trajanje ŠB (OP 1,367; 95%CI 1,104-1,692), a potom i eGFR (1,428; 95%CI 1,083-1,882) te na koncu i vrijednost albumina u 24-satnom urinu te upotrebu ACEI (OP 1,813; 95%CI 1,143-2,875), Graf 10.

Graf 8. Binarna logistička regresija; povezanost aktivnosti DPP-4 sa metaboličkim sindromom kao nezavisnom dihotomnom varijablom (MS prisutan u ispitanika =1; nije prisutan=0) te izmjerenom vrijednost serumske DPP-4 aktivnosti kao zavisnom varijablom u četiri različita modela.



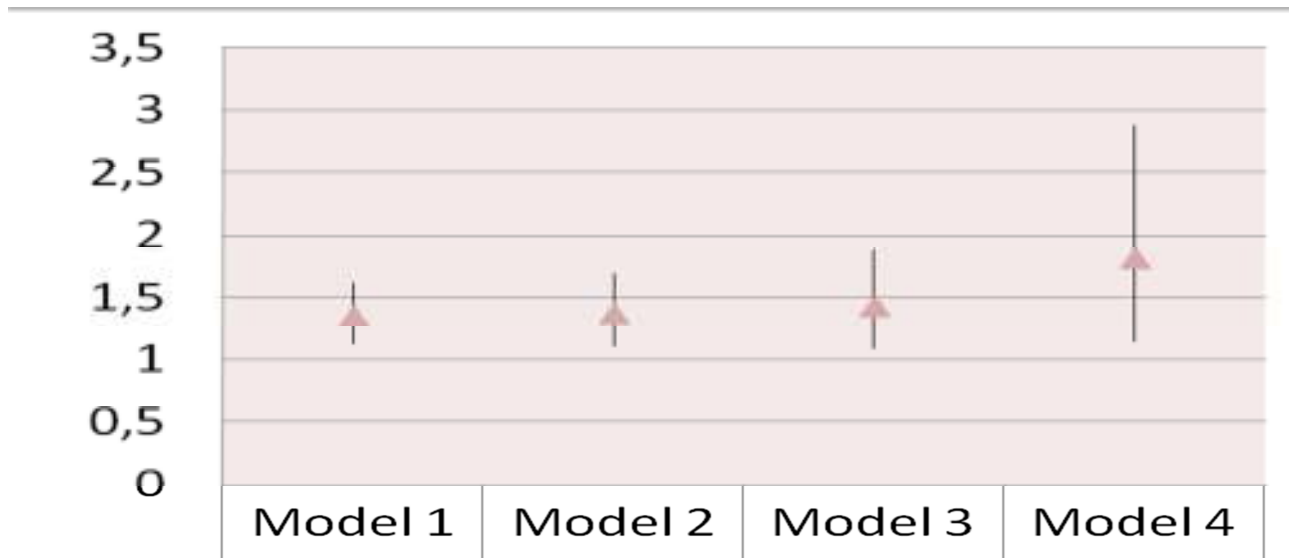
Legenda: Model 1. neprilagođena izmjerena vrijednost serumske DPP-4 aktivnosti; Model 2.- izmjerena vrijednost DPP-4 aktivnosti prilagođena za dob, spol i trajanje ŠB; Model 3.- izmjerena vrijednost DPP-4 aktivnosti prilagođena za dob, spol, trajanje ŠB te eGFR, Model 4.- izmjerena vrijednost DPP-4 aktivnosti prilagođena za dob, spol, trajanje ŠB, eGFR te upotrebu ACEI i hipolipemika.

Graf 9. Binarna logistička regresija; povezanost aktivnosti DPP-4 sa DR kao nezavisom dihotomnom varijablom (DR prisutna u ispitanika =1; nije prisutna=0) te izmjerenom vrijednost serumske DPP-4 kao zavisnom varijablom u četiri različita modela.



Legenda: Model 1. neprilagođena izmjerena vrijednost serumske DPP-4 aktivnosti; Model 2.- izmjerena vrijednost DPP-4 aktivnosti prilagođena za dob, spol i trajanje ŠB; Model 3.- izmjerena vrijednost DPP-4 aktivnosti prilagođena za dob, spol, trajanje ŠB te eGFR, Model 4.- izmjerena vrijednost DPP-4 aktivnosti prilagođena za dob, spol, trajanje ŠB, eGFR, izmjerenu vrijednost albumina u 24-satnom urinu te upotrebu ACEI.

Graf 10. Binarna logistička regresija; povezanost aktivnosti DPP-4 sa autonomnom neuropatijom kao nezavisnom dihotomnom varijablom (autonomna neuropatija prisutna u ispitanika =1; nije prisutna=0) te izmjerenom vrijednost serumske DPP-4 kao zavisnom varijablom u četiri različita modela.



Legenda: Model 1. neprilagođena izmjerena vrijednost serumske DPP-4 aktivnosti; Model 2.- izmjerena vrijednost DPP-4 aktivnosti prilagođena za dob, spol i trajanje ŠB; Model 3.- izmjerena vrijednost DPP-4 aktivnosti prilagođena za dob, spol, trajanje ŠB te eGFR, Model 4.- izmjerena vrijednost DPP-4 aktivnosti prilagođena za dob, spol, trajanje ŠB, eGFR, izmjerenu vrijednost albumina u 24-satnom urinu te upotrebu ACEI.

6. RASPRAVA

Ovo istraživanje provedeno je s ciljem ispitivanja povezanosti serumske aktivnosti DPP-4 sa stupnjem IR (mjerene pomoću stope raspoloživosti glukoze, eGDR) te prisutnošću MS i mikrovaskularnih komplikacija: retinopatijom, dijabetičkom bolesti bubrega te perifernom i autonomnom neuropatijom u osoba s tipom 1 ŠB.

Inzulinska rezistencija se smatra okosnicom MS te stoga predstavlja važan patofiziološki čimbenik u nastanku angiopatskih oboljenja, predležecog uzroka morbiditeta i mortaliteta današnjice (110, 111). Posljednjih je desetljeća MS dosegno gotovo epidemijske razmjere u zemljama razvijenog svijeta (112), a prema posljednjim podacima prisutan je i u do 40% osoba sa tipom 1 ŠB te 60% osoba sa tipom 2 ŠB (57). Usporedno s povećanjem incidencije MS u svijetu raste i broj osoba s mikrovaskularnim komplikacijama ŠB (52). Najčešća klinička manifestacija MS je visceralna debljina koja podrazumijeva nakupljanje masnog tkiva u abdominalnoj šupljini, a ono je za razliku od supkutanog, metabolički i endokrinološki izuzetno aktivan organ (113). Endokrinološka uloga visceralnog masnog tkiva u ovom kontekstu odnosi se primarno na sintezu adipo(cito)kina uključenih u patofiziologiju nastanka IR i MS (65, 66). Stoga su znanstvena istraživanja usmjerena ka njihovoj identifikaciji i ulozi u endokrinološkim procesima u središtu znanstvenog i stručnog interesa.

Kako je klinička primjena inhibitora DPP-4 aktivnosti u liječenju tipa 2 ŠB inicijalno polučila dobre rezultate, a IR se smatra predležecim uzrokom ovog tipa ŠB, Firneisz i sur. (2010) (96) su istražili aktivnost ovog enzima u serumu u osoba s tipom 2 ŠB te konkomitantnom nealkoholnom masnom bolešću jetre (NAFLD, eng. non-alcoholic fatty liver disease), prominentnom karakteristikom IR, zatim u osoba sa tipom 2 ŠB bez NAFLD te zdravoj populaciji. Rezultati njihovog istraživanja pokazali su da je aktivnost DPP-4 u serumu viša u osoba s tipom 2 ŠB te konkomitantnom NAFLD u usporedbi sa istom skupinom bolesnika bez NAFLD te zdravom populacijom. Dodatno, ukazali su na značajnu korelaciju DPP-4 aktivnosti sa IR procijenjenom HOMA indeksom. Moguća uloga serumske aktivnosti DPP-4 u patofiziologiji IR dodatno dobiva na značaju godinu dana kasnije kada su Lamers i sur. (2011.) (67) identificirali izražaj DPP-4 molekule na površini stanica visceralnog masnog tkiva te njenu povećanu serumsku koncentraciju u uvjetima IR. Dodatno, pokazali su i da primjena inhibitora DPP-4 enzima rezultira pojačanom aktivacijom PIK-3 (fiziološkog puta unutarstanične inzulinske signalizacije) (67) te na taj način smanjuje IR u adipocitima, glatkim i poprečno-prugastim mišićnim stanicama.

Iako je viša serumska DPP-4 aktivnost kod osoba sa ŠB tipa 1 u usporedbi sa zdravom populacijom od ranije poznata (82), kako u pedijatrijskoj (87), tako i u odrasloj dobi (82, 87), njena povezanost sa IR u ovoj skupini bolesnika do sada nije sustavno istraživana. Nalaz je primarno smatran manifestacijom imunološkog zbivanja u patogenezi same bolesti s obzirom da se DPP-4 molekula nalazi na T-limfocitima te sudjeluje u njihovoj aktivaciji. Ovo istraživanje pokazuje da je u tipu 1 ŠB serumska DPP-4 aktivnost u pozitivnoj korelaciji s IR kao što je ranije nađeno u tipu 2 ŠB. Naime, skupina ispitanika s tipom 1 ŠB koja je imala više vrijednosti izmjerene DPP-4 aktivnosti ujedno je imala veću IR kao i učestalost MS u usporedbi sa skupinom niže DPP-4 aktivnosti nakon prilagodbe za sve čimbenike koji bi mogli interferirati sa enzimatskom aktivnošću DPP-4 i/ili IR *per se* kako je ranije opisano od strane Iwabuchija i sur (2013.) (87).

Kao što pokazuju objavljeni rezultati dviju nezavisnih studija drugih autora (82, 87), ni u ovom istraživanju DPP-4 aktivnost u serumu nije pokazala značajnu povezanost sa titrom autoantitijela povezanih sa ŠB tip 1 (ICA, GAD i IA-2). Aktivnost DPP-4 pokazala je značajnu korelaciju s dobi što potencijalno stavlja dodatni naglasak na njenu važnost u patogenezi IR u tipu 1 ŠB, s obzirom da su i IR i MS prominentnije karakteristike kasne i starije odrasle životne dobi (58-61, 114).

Viša DPP-4 aktivnost u korelaciji s višom IR nije pokazala značajnu povezanost sa glukoregulacijom procijenjenom sa HbA1c što je u skladu sa ranije objavljenim istraživanjima (82, 87, 96). Ovaj bi se rezultat mogao objasniti podatkom da je skupina ispitanika s višom DPP-4 aktivnošću i većom IR ujedno imala veće doze inzulina u liječenju koji posljedično doprinosi boljoj glukoregulaciji, ali s druge strane i povećanju IR u istih ispitanika. Naime, smatra se kako je IR u tipu 1 ŠB posljedica kombiniranog učinka izloženosti suprafiziološkim dozama egzogeno primjenjenog inzulina te visceralne pretilosti koje zbirno rezultiraju poremećajem unutarstaničnog metabolizma glukoze te inhibicijom inzulinom inducirane supresije sinteze slobodnih masnih kiselina (115). Dodatno, skupina ispitanika s višom DPP-4 aktivnošću imala je veći ITM te veći opseg struka kao pokazatelja centralnog/visceralnog adipoziteta. Ipak, potonji rezultat dosegao je statističku razinu značajnosti samo u osoba ženskog spola. Takav nalaz može se objasniti činjenicom kako su osobe ženskog spola usljed promjene hormonskog statusa u procesu starenja sklonije nakupljanju masnog tkiva u području trbuha, a samim time i IR (114, 115). Ipak, statistička značajnost korelacije DPP-4 aktivnosti s IR nije se promijenila ni nakon korekcije za dob, spol i trajanje bolesti što moguće naglašava njenu ulogu kao neovisnog čimbenika rizika za razvoj IR.

Nadalje, ispitanici u skupini s višom izmjerenom aktivnošću DPP-4 u serumu imali su značajno više vrijednosti sistoličkog arterijskog tlaka u usporedbi sa skupinom ispitanika sa nižom izmjerenom enzimatskom aktivnošću. Takav nalaz ne može se objasniti učestalošću upotrebe koknomitantne antihipertenzivne terapije, jer je i upotreba antihipertenziva (ACEI) bila češća u ispitanika sa višom DPP-4 aktivnošću. Moguće objašnjenje ovakvog nalaza je viša IR u navedenoj skupini ispitanika.

Kako je u uvodu istaknuto, povezanost IR s endotelnom disfunkcijom i sintezom NO, najvažnijim endogenim vazodilatatorom često je zanemarena u kontekstu sindroma IR (52). Naime, endotelne stanice koje oblažu unutaraju stijenku krvnih žila ne predstavljaju samo propusnu barijeru između krvi i stijenke žila. Lučenjem različitih vazokonstriktivnih i vazodilatativnih čimbenika, inhibitora i promotora rasta te upalnih medijatora, one reguliraju rast i migraciju glatkih mišićnih stanica te posreduju procese vazokonstrikcije i vazodilatacije (52). Fiziološki učinak inzulina posredovan PIK-3 stimulira sintezu NO te diferencijaciju, a inhibira proliferaciju glatkih mišićnih stanica krvnih žila. Kada zbog IR signalni put PIK-3 bude inhibiran nadvlada ga signalni put MAP kinaze, smanjuje se sinteza NO, a ravnoteža u krvnim žilama pomiče se u korist vazokonstrikcije što dovodi do porasta krvnog tlaka (116). Posljednično dolazi do ozljede endotela što je nadalje praćeno proliferacijom glatkih mišićnih stanica te povišenjem krvnog tlaka (52, 115, 116). Ovom procesu pridonose i od ranije poznati adipo(cito)kini udruženi s IR, ponajprije TNF- α i interleukin 6 (115).

Prema ovom istraživanju jedinični porast sistoličkog krvnog tlaka od ~1,2 mmHg je u korelaciji sa jediničnim povišenjem DPP-4 aktivnosti po korekciji za hipertenzivne rizične čimbenike te stoga nije moguće isključiti neposredni učinak DPP-4 na vaskulaturu. Rezultati posljednjih kliničkih ispitivanja govore da upotreba DPP-4 inhibitora rezultira poboljšanjem elasticiteta krvnih žila i posljedičnim sniženjem krvnog tlaka (117, 118). Međutim, ostaje nejasno da li je riječ o neposrednom učinku inhibicije enzima na površini endotela ili o u GLP-1 ovisnom mehanizmu, za koje je pleiotropni povoljan učinak na kardiovaskularni sustav, uključujući i sniženje krvnog tlaka više puta dokazan (119, 120). U svakom slučaju, bilo neposrednom stimulacijom sinteze NO, bilo posredno, putem GLP-1 i njegovog receptora, inhibicija DPP-4 rezultira povećanjem biorasploživosti NO, vazodilatacijom i sniženjem krvnog tlaka (121).

Inzulinska rezistencija rezultira inhibicijom inzulinom inducirane supresije sinteze slobodnih masnih kiselina pa se povećava njihov protok kroz jetru gdje pojačano oksidiraju do acetilkoenzima A, prekursora svih ostalih masnih kiselina (122, 123). Istodobno se povećava sinteza triglicerida (TG) i kolesterola vrlo male gustoće (LDL- kolesterola), a smanjuje

koncentracija kolesterola visoke gustoće (HDL-kolesterola). Smatra se da do povećane sinteze kolesterola vrlo male gustoće (VLDL) i razvoja hipertrigliceridemije u osoba s IR dolazi zbog smanjene osjetljivosti jetrenih stanica na djelovanje inzulina (122).

Aroor i sur. (2015) su na modelu eksperimentalnih životinja pokazali da inhibicija serumske DPP-4 enzima aktivnosti dovodi do sniženja IR u jetri što posljedično djeluje i na oksidaciju masnih kiselina hepatocitima rezultirajući smanjenom produkcijom TG i LDL-kolesterola (124). Dodatno, Kusunoki i sur. su ispitivanjem utjecaja DPP-4 inhibitora alogliptina na glukoregulaciju na japanskoj populaciji primjetili da njegova primjena dovodi do sniženja ukupnog i LDL-kolesterola, a da je učinak održan i nakon gubitka kontrole glikemije (98). Povezanost DPP-4 aktivnosti s lipidnim profilom ovim istraživanjem nije moguće potvrditi, ali niti u potpunosti odbaciti. Naime, iako su ispitanici s višom aktivnošću DPP-4 imali veću koncentraciju ukupnog i LDL-kolesterola, razlika nije dosegla statističku razinu značajnosti. S druge strane, u istoj je skupini statistički značajno veći broj ispitanika u terapiji je imao statin što zasigurno interferira s dobivenim rezultatom.

Zbirno gledano, IR i sve komponente koje ulaze u dijagnostičke kriterije MS pokazale su se izraženijima u skupini ispitanika s višom serumskom DPP-4 aktivnošću. Prisutnost MS u ~45% ispitanika otprilike je u skladu s ranije objavljenim studijama (57, 58, 125). Sve one naglašavaju njegovu važnost u razvoju vaskularnih komplikacija bolesti.

Dijabetička retinopatija bila je prisutna u ~60% ispitanika što je u skladu sa ranijim istraživanjima među osobama sa ŠB tipa 1 (126, 127). Prema rezultatima epidemiološke studije o DR Wisconsin (the Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy) gotovo svi bolesnici razviju ovu komplikaciju unutar prva dva desetljeća od dijagnoze bolesti (128).

Hiperglikemija i dislipidemija koje rezultiraju oksidativnim stresom uz arterijsku hipertenziju smatraju se glavnim čimbenicima rizika za oštećenje retinalnog endotela koji posjeduje vrlo ograničenu sposobnost samoreparacije zbog čega postepeno dolazi do arhitektonskih promjena mikrovaskulature očne pozadine gradirajući od umjerene do teške NPDR prema PDR (129). Proces samoreparacije retinalnog endotela uvelike ovisi o prisutnosti endotelnih progenitornih stanica (EPCs, eng. endothelial progenitor cells) koje su uglavnom smještene u koštanoj srži, a po potrebi se otpuštaju u cirkulaciju posredovanjem čimbenika α deriviranog iz stromalne stanice (SDF α , eng. stromal derived factor α) (130). Smanjena raspoloživost EPCs usljed smanjene raspoloživosti SDF α dokazana je na eksperimentalnom modelu inzulin-deficijentne ŠB u životinja (131). Stoga se ne može isključiti ni njegov doprinos patofiziologiji nastanka DR. Čimbenika α deriviran iz stromalne stanice jedan je od brojnih substrata DPP-4 enzima (88) što znači da je njegova koncentracija manja usljed više DPP-4

aktivnosti. Na taj bi se način mogla objasniti pozitivna povezanost vrijednosti DPP-4 aktivnosti s prisutnošću DR koja je prema rezultatima ovog ispitivanja zadržala statističku razinu značajnosti i nakon prilagodbe za ostale rizične čimbenike.

Berndt-Zipfel i sur. (2013) (132) su ispitivanjem utjecaja primjene linagliptina na vazomotorni odgovor krvnih žila očne pozadine pokazali da inhibicija DPP-4 povećava retinalni protok krvi, a klinička ispitivanja primjene drugih DPP-4 inhibitora sugeriraju njihov doprinos smanjenoj incidenciji i progresiji DR u tipu 2 ŠB (133, 134). Uzveši u obzir ranije spomenute pleiotropne učinke primjene DPP-4 inhibitora u liječenju ŠB tipa 2: glukoregulacija, smanjenje krvnog tlaka te povoljan učinak na dislipidemiju, nije moguće donijeti zaključak da li je ovdje riječ o neposrednom učinku samog enzima, posrednom učinku putem SDF α ili nekog drugog substrata. Naime, posljednji rezultati eksperimentalnih istraživanja upućuju na povoljan učinak primjene GLP-1 analoga (pripravaka homolognih endogenom GLP-1 kojima je struktura izmijenjena na način da su otporni na DPP-4 posredovanu razgradnju) u topičkom obliku na patofiziološke procese u podlozi DR (135): prvenstveno arhitektonske promjene vaskulature ali i na neurodegenerativne promjene u očnoj pozadini što je osobito izraženo u uznapredovalom obliku bolesti.

Početne strukturalne patohistološke promjene koje karakteriziraju DR analogne su onima koje se viđaju u dijabetičkoj bolesti bubrega a uključuju: gubitak podocita, stanjenje bazalne membrane glomerula te stvaranje mezangijalnih mikroaneurizmatičkih proširenja (136, 137). Patološko izlučivanje albumina mokraćom je primarna klinička manifestacija bolesti koja nerijetko koincidira s razvojem DR (137), a ujedno se smatra i njenim rizičnim čimbenikom (138). Rezultati ovog ispitivanja dijelom potvrđuju navedenu spoznaju: 18,6% ispitanika imalo je dijabetičku bolest bubrega, statistički značajno češće prisutnu u skupini ispitanika sa višom DPP-4 aktivnošću. To je u nesrazmjeru s ukupnim brojem ispitanika koji su imali DR, međutim jest u skladu s brojem onih koji su imali teži stupanj DR, odnosno PDR. Moglo bi se zaključiti kako rizični čimbenici koji pogoduju razvoju obje mikrovaskularne komplikacije uključujući hiperglikemiju, hipertenziju i dislipidemiju što je od ranije poznato (136), možda uključuju i serumsku DPP-4 aktivnost. Naime, multivarijatnom linearnom regresijskom analizom u kojoj je DPP-4 aktivnost modificirana za sve navedene rizične čimbenike uključivši i tzv. nefroprotektivnu dozu ACEI, jedinični porast enzimske aktivnosti rezultirao je smanjenjem procijenjene bubrežne filtracije od 1,49 mL/min/1.73m².

Iako je smanjen izražaj DPP-4 molekule na staničnoj površini glomerula uz njenu povišenu serumsku aktivnost poznat unatrag nekoliko godina (98), a klinička primjena DPP-4 inhibitora za sada pokazuje povoljan utjecaj na bubrežnu funkciju (139), točna uloga DPP-4

enzima u patogenezi dijabetičke bolesti bubrega nije u potpunosti razjašnjena. Liu i sur. (2012) (140) su na streptozotocinom induciranom inzulin-deficijentnom modelu ŠB u glodavaca pokazali da inhibicija DPP-4 rezultira sprečavanjem promjena na bazalnoj membrani glomerula. Stajališta su kako je to posljedica smanjenja transformirajućim faktorom rasta $\beta 1$ (eng. Transforming Growth Factor $\beta 1$, TGF $\beta 1$) posredovanog nakupljanja makrofaga u glomerularnoj bazalnoj membrani i smanjenja proizvodnje slobodnih radikala koji bi mogli dovesti do daljnjeg tkivnog oštećenja, neovisno o razini glikemije. Aktivacija i mobilizacija makrofaga putem TGF $\beta 1$ je naime u pozitivnoj korelaciji da DPP-4 aktivnošću. S druge strane, Higashijima i sur. (2015) (141) smatraju kako je infiltracija bazalne membrane makrofazima posredovana inaktivacijom GLP-1 receptora usljed nedostatka substrata, GLP-1, zbog njegove degradacije DPP-4 enzimom. Prema rezultatima njihovog istraživanja, i administracija GLP-1 analoga i alogliptina ekvivalentno je rezultirala smanjenjem upalnog procesa na bazalnoj membrane glomerula. Ipak, više dokaza govori u prilog GLP-1 neovisnog nefroprotektivnog učinka inhibicije DPP-4, putem regulacije vrijednosti krvnog tlaka i glikemije (141, 142). Iako je riječ o komponentama MS, a IR kao njegova okosnica pozitivno korelira sa albuminurijom i u tipu 1 i u tipu 2 ŠB (143, 144), ovo istraživanje ukazuje da bi DPP-4 aktivnost mogla biti neovisni biljeg dijabetičke bolesti bubrega s obzirom da se statistička razina značajnosti njene obrnuto proporcionalne povezanosti sa eGFR zadržala i nakon prilagodbe za stupanj IR.

Najčešća mikrovaskularna komplikacija među ispitanicima ovog istraživanja sa učestalošću od preko 80% bila je periferna dijabetička polineuropatija, dok je autonomna neuropatija dijagnosticirana u ~40% ispitanika što je u skladu sa činjenicom da je DN najčešća komplikacija ŠB (145, 146). Senzomotorna DN bila je učestalija u skupini ispitanika s višom DPP-4 aktivnošću, međutim vjerojatno s obzirom na visoku zastupljenost ove komplikacije među ispitanicima, nalaz se nije pokazao statistički značajnim. Iako je značaj DPP-4 molekule u signalizacijskom putu živčanog sustava prepoznat (147), do sada nije dokazana njena prisutnost u membrani aksona te stoga nije moguće donijeti zaključak kojim bi se na neposredan način objasnila povezanost aktivnosti DPP-4 i DN. Ipak, Jin i sur. (2009) (148) su na eksperimentalnom životinjskom modelu dokazali da primjena vildagliptina tijekom 32 tjedna štiti od gubitka mijeliniziranih i nemijeliniziranih živčanih vlakana. Moguće je da DPP-4 inhibicija uplitanjem u međudjelovanje metaboličkih, vaskularnih i imunoloških čimbenika koji dovode do progresivnog oštećenja perifernih živčanih vlakana ostvaruje navedeni učinak (149). Posljednje metaanalize ukazuju na važnu ulogu TNF α u patogenezi senzomotorne DN

(150), a s obzirom da je DPP-4 aktivnost u pozitivnoj korelaciji sa TNF α (151) moglo bi biti riječ o još jednom mehanizmu utjecaja DPP-4 u patogenezi senzomotorne DN.

Prisutnost autonomne neuropatije bila je statistički značajno veća u ispitanika s višom DPP-4 aktivnosti i većim stupnjem IR. Postoji više načina kojima poremećaj autonomne funkcije može utjecati na IR i obrnuto. Gušterača, jetra i skeletni mišići koji su redom odgovorni za inzulinsku sekreciju, glukoneogenezu te utilizaciju glukoze inervirani su autonomnim živcima (1), a dosadašnja istraživanja upućuju na povezanost autonomne funkcije sa IR (152, 153) iako njihov specifičan uzročno posljedični međuodnos nije do kraja razjašnjen. Ako se u obzir uzme podatak da je u osoba s IR uz još uvijek urednu toleranciju glukoze prisutna predominacija simpatičkog nad parasimpatičkim živčanim sustavom u odgovoru na endogenu hiperinzulinemiju (153, 154) moglo bi se zaključiti da IR prethodi autonomnoj neuropatiji. Autonomna neuropatija se s druge strane smatra prediktivnim čimbenikom razvoja i progresije dijabetičke bolesti bubrega (155), a nađena je i povezanost s DR u osoba sa tipom 1 ŠB uz urednu bubrežnu funkciju (143). To je u skladu s rezultatima ovog istraživanja jer je skupina ispitanika sa višom DPP-4 aktivnosti uz autonomnu neuropatiju imala i veću učestalost DR i dijabetičke bolesti bubrega. Međutim, važno je naglasiti da rezultati ovog ispitivanja upućuju na značajnu povezanost DPP-4 aktivnosti te autonomne neuropatije uzevši u obzir sve navedene potencijalne čimbenike rizika. Iako nije moguće donositi generalizirane zaključke, ovakav rezultat ipak implicira na neku vrstu povezanosti DPP-4 aktivnosti i autonomne neuropatije koja izlazi iz okvira IR, a što s obzirom na široki spektar substrata ovog enzima kao i peptida uključenih u njegovu regulaciju, i nije iznenađujuće.

7. ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem je pokazano da aktivnost DPP-4 u serumu korelira sa IR, okosnicom MS, te da je pozitivno povezana sa njegovom prisutnošću u osoba sa tipom 1 ŠB.

Aktivnost DPP-4 u serumu povezana je i sa mikrovaskularnim komplikacijama bolesti: retinopatijom, dijabetičkom bolesti bubrega i autonomnom neuropatijom.

S obzirom na presječni dizajn ispitivanja te veličinu uzorka nije moguće donijeti generalizirani zaključak da li viša DPP-4 aktivnost u serumu predstavlja patofiziološki čimbenik razvoja mikrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti. Moguće je da je povišena DPP-4 aktivnost tek odraz IR za koju je od ranije poznato da povećava rizik mikrovaskularnih komplikacija. U svrhu razjašnjavanja ove uzročno posljedične veze potrebna su daljnja prospektivna istraživanja.

8. SAŽETAK

Cilj: Dipeptidil peptidaza-4 (DPP-4) je ubikvitarna serinska proteaza odnedavno poznata i kao adipocitokin povezan s inzulinskom rezistencijom (IR) koja predstavlja okosnicu metaboličkog sindroma (MS) te čimbenik rizika za razvoj mikrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti (ŠB). Cilj ovog istraživanja bio je ispitati povezanost aktivnosti DPP-4 u serumu s inzulinskom osjetljivošću, MS te mikrovaskularnim komplikacijama ŠB: retinopatijom, dijabetičkom bolesti bubrega te neuropatijom u osoba sa tipom 1 ŠB. -

Metode i ispitanici: U istraživanje su uključene 43 osobe sa tipom 1 ŠB dobi između 18 i 65 godina. Inzulinska osjetljivost procijenjena je pomoću stope raspoloživosti glukoze (eGDR) koja obrnuto korelira sa stupnjem IR. Aktivnost DPP-4 u serumu određena je spektrofotometrijski brzinom razgradnje H-Gly-Pro-amino-metil kumarina (AMC) u 7-Amino-4-AMC.

Rezultati: Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine prema srednjoj vrijednosti DPP-4 aktivnosti u serumu (32,52 U/L). Skupina ispitanika sa DPP-4 aktivnošću >32,52 U/L imala je nižu eGDR ($p < 0.001$), nižu procijenjenu glomerularnu filtraciju (eGFR) ($p = 0.021$) te veću učestalost neproliferativne i proliferativne retinopatije ($p < 0.001$) i autonomne neuropatije ($p = 0.001$). Linerna regresijska analiza pokazala je kako za svaki jedinični porast aktivnosti DPP-4 u serumu eGDR opada za $0,218 \text{ mgkg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, a eGFR za $1,49 \text{ ml/min/1,73m}^2$ nakon prilagodbe za dob, spol, trajanje ŠB, HbA1c te upotrebu statina i antihipertenziva. Multivarijatna multinominalna raščlamba pokazala je da je aktivnost DPP-4 u serumu povezana sa MS (1,392 (1,206-1,941)) te učestalošću retinopatije (1,388 (1,089-1,645)) i autonomne neuropatije (1,813 (1,143-2,875)).

Zaključak: Viša aktivnost DPP-4 u serumu povezana je s IR, nižom eGFR te većom učestalošću retinopatije i autonomne neuropatije u osoba sa ŠB tipa 1. Njen prediktivni značaj u patofiziologiji IR i razvoja mikrovaskularnih komplikacija potrebno je razjasniti daljnjim istraživanjima.

Ključne riječi: dipeptidil peptidaza-4, inzulinska osjetljivost, mikrovaskularne komplikacije, šećerna bolest tip 1

9. SUMMARY

Relationship between serum dipeptidyl peptidase-4 activity and insulin sensitivity, metabolic syndrome and microvascular complications prevalence in type 1 diabetic patients

Kristina Blaslov, 2016.

Background: Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) is a serine protease recently linked to insulin resistance (IR), metabolic syndrome (MS) and microvascular complications in diabetes. We investigated the relationship between serum DPP-4 activity, IR, MS and microvascular complications in persons with type 1 diabetes (PWT1D).

Methods: The study comprised 43 PWT1D aged >18 and <65 years. Insulin sensitivity was calculated using the equation for estimated glucose disposal rate (eGDR) which is in inverse correlation with IR. DPP-4 activity was determined spectrophotometrically as a rate of cleavage of 7-Amino-4-Methyl Coumarin (AMC) from H-Gly-Pro-AMC.

Results: Participants were divided according to median DPP-4 serum activity (32.52 U/L) into two groups. Those with higher serum DPP-4 activity had lower eGDR ($p < 0.001$), estimated glomerular filtration rate (eGFR) ($p = 0.021$) while higher retinopathy ($p < 0.001$) and autonomic neuropathy presence ($p = 0.001$). The linear regression showed that eGDR decreases for $0.218 \text{ mgkg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ and eGFR for $1,49 \text{ ml/min/1,73m}^2$ by each increase of DPP-4 activity of 1 U/L after appropriate adjustments. Multivariate binary regression found that DPP-4 activity is associated with MS (1.392 (1.206-1.941), retinopathy (1.388 (1.089-1.645)) and autonomic neuropathy (1.813 (1.143-2.875)) presence.

Conclusion: Serum DPP-4 activity is associated with IR, MS and the presence of microvascular complications in PWT1D. Its role in the pathophysiology of IR and microvascular complications merits to be further investigated.

Key words: dipeptidyl peptidase-4, insulin resistance, microvascular complications, type 1 diabetes

10. LITERATURA

1. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2005.
2. IDF Diabetes Atlas, 6th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2013.
<http://www.idf.org/diabetesatlas> (*pristupljeno Aug 12, 2015*)
3. Roglic G, Unwin N. Mortality attributable to diabetes: Estimates for the year 2010. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;87(1):15–19.
4. http://www.who.int/diabetes/publications/diagnosis_diabetes2006/en/ (accessed Aug 12, 2015)
5. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care.* 2014;37 Suppl 1:S14–80.
6. Fonseca VA. Defining and characterizing the progression of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009;32 Suppl 2:S151 - 156.
7. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet.* 2012;379:2279–90.
8. http://www.who.int/diabetes/publications/diagnosis_diabetes2011/en/index.html (*pristupljeno Aug 12, 2015*)
9. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA et al. Association of glycaemia with microvascular and macrovascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *Br Med J* 2000; 321:405-12.
10. White MF et Kahn RC. The Insulin Signaling System. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994; 269: 1-4.
11. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 34 2011; (Suppl 1):S62-S69.
12. Bach JF. Etiology and pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus, In: Volpe R, ed. *Autoimmune endocrinopathies*, Tolowa, NJ: Humana Press, 1999:293-307.
13. Todd JA. From genome to aetiology in a multifactorial disease, type 1 diabetes. *Bioassays.* 1999;21:164-174.
14. Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterised by rapid onset and an absence of diabetes related antibodies. Osaka IDDM Study Group. *N Engl J Med.* 2000;342:301-307.
15. Pinhas-Hamlel O, Dolan LM, Daniels SR et al. Increased incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus among adolescents. *J Pediatr* 1996; 128:608-615.

16. Nepom GT, Kwok WW. Perspectives in diabetes: molecular basis for HLA-DQ associations with IDDM. *Diabetes* 1998;17:117-1184.
17. Noble JA, Valdes AM, Cook M et al. The role of HLA class II genes in insulin dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. *Am J Hum Genet* 1996;59:1134-1146.
18. World Health Organization G. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. 2006.
19. Cutolo M. Autoimmune polyendocrine syndromes. *Autoimmun Rev*. 2014;13(2):85-9.
20. Betterle C, Zanchetta R. Update on autoimmune polyendocrine syndromes (APS). *Acta Biomed*. 2003;74(1):9-33.
21. Zhernakova A, Withoff S, Wijmenga C. Clinical implications of shared genetics and pathogenesis in autoimmune diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2013 Nov;9(11):646-59.
22. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*. 1983 Dec 23;222(4630):1337-9. PubMed PMID: 6362005.
23. Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*. 1990 Sep 13;347(6289):151-6.
24. Hawa M, Rowe R, Lan MS, Notkins AL, Pozzilli P, Christie MR, et al. Value of antibodies to islet protein tyrosine phosphatase-like molecule in predicting type 1 diabetes. *Diabetes*. 1997 Aug;46(8):1270-5.
25. Kawasaki E, Eisenbarth GS, Wasmeier C, Hutton JC. Autoantibodies to protein tyrosine phosphatase-like proteins in type I diabetes. Overlapping specificities to phogrin and ICA512/IA-2. *Diabetes*. 1996 Oct;45(10):1344-9.
26. Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E. Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *Journal of immunology*. 1995 Dec 1;155(11):5419-26.
27. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*. 1994 Nov 24;331(21):1428-36.
28. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007 Oct 23;104(43):17040-5.

29. Vardi P et al. Concentration of insulin autoantibodies at onset of type I diabetes. Inverse log-linear correlation with age. *Diabetes Care* 1988 11(9):736-9.
30. Achenbach P et al. Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibody characteristics. *Diabetes*. 2004 53(2):384-92. Erratum in: *Diabetes*. 2004 53(4):1175-6.
31. Ginseng-Feller F, Witt Me, Ygihashi S et al. Congenital rubella syndrome as a model for type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus: increased prevalence of insulin-surface autoantibodies. *Diabetologia* 1984;27:87-89.
32. Atkinson MA, Bluestone JA, Eisenbarth GS, Hebrok M, Herold KC, Accili D, et al. How does type 1 diabetes develop?: the notion of homicide or beta-cell suicide revisited. *Diabetes*. 2011 May;60(5):1370-9.
33. Nokoff N, Rewers M. Pathogenesis of type 1 diabetes: lessons from natural history studies of high-risk individuals. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013 Apr;1281:1-15. PubMed PMID: 23360422.
34. Dahlquist G. Environmental factors in human type 1 diabetes-an epidemiological perspective. *Diabetes Metab Rev* 1998;11:37-46.
35. Chillaron JJ, Goday A, Pedro-Botet J. [Metabolic syndrome, type 1 diabetes mellitus and insulin resistance]. *Medicina clinica*. 2008 Apr 5;130(12):466-70. Síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 1 y resistencia a la insulina.
36. Kramer CK, Rodrigues TC, Canani LH, Gross JL, Azevedo MJ. Diabetic retinopathy predicts all-cause mortality and cardiovascular events in both type 1 and 2 diabetes: meta-analysis of observational studies. *Diabetes care*. 2011; 34(5): 1238–1244.
39. Lachin JM, Genuth S, Nathan DM, Zinman B, Rutledge BN, Group DER. Effect of glycemic exposure on the risk of microvascular complications in the diabetes control and complications trial--revisited. *Diabetes*. 2008;57(4):995-1001.
40. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *The New England journal of medicine*. 1993 30;329(14):977-86.
41. Temelkova-Kurktschiev TS, Koehler C, Henkel E, Leonhardt W, Fuecker K, Hanefeld M. Postchallenge plasma glucose and glycemic spikes are more strongly associated with atherosclerosis than fasting glucose or HbA1c level. *Diabetes care*. 2000;23(12):1830-4.
42. Monnier L, Colette C. Glycemic variability: should we and can we prevent it? *Diabetes care*. 2008;31 Suppl 2:S150-4.

43. Kain V, Kapadia B, Misra P and Saxena U. Simvastatin may induce insulin resistance through a novel fatty acid mediated cholesterol independent mechanism. *Sci. Rep.* 2015;5, 13823; doi: 10.1038/srep13823.
44. Yip J, Mattock MB, Morocutti A, Sethi M, Trevisan R, Viberti G. Insulin resistance in insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Lancet.* 1993 Oct 9;342(8876):883-7.
45. Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkin SL. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and complication risk in type 1 diabetes: "double diabetes" in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes care.* 2007 Mar;30(3):707-12.
46. Flakoll PJ, Jensen MD, Cherrington AD. Physiological action of insulin. U: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, (ur.) *Diabetes Mellitus: A fundamental and clinical text.* 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2004, p. 165-81.
47. Yki-Järvinen H, Helve E, Koivisto VA. Hyperglycemia decreases glucose uptake in type I diabetes. *Diabetes* 1987; 36(8):892-896.
48. Schauer IE, Snell-Bergeon JK, Bergman BC, Maahs DM, Kretowski A, Eckel RH, Rewers M. Insulin resistance, defective insulin-mediated fatty acid suppression, and coronary artery calcification in subjects with and without type 1 diabetes. *Diabetes* 2011; 60(1):306-314.
49. DeFronzo RA, Hendler R and Simonson D. Insulin resistance is a prominent feature of insulin dependent diabetes. *Diabetes* 1982; 31: 795-801.
50. Cosentino F, Luscher TF. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32:S54-S61.
51. Olatunbosun S and Dagogo - Jack S. Insulin Resistance. In; 2010.
52. Hayden M, Tyagi S. Is type 2 diabetes mellitus a vascular disease (atheroscleropathy) with hyperglycemia a late manifestation? The role of NOS, NO, and redox stress. *Cardiovasc Diabetol.* 2003;12(2):2.
53. DeFronzo R. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claud Bernard Lecture 2009. *Diabetologia* 2010;53:1270 - 1287.
54. Del Prato S. Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. *Diabet Med* 2009;26(12):1185 - 1192.
55. Szendroedi J, Schmid AI, Meyerspeer M, Cervin C, Kacerovsky M, Smekal G, et al. Impaired mitochondrial function and insulin resistance of skeletal muscle in mitochondrial diabetes. *Diabetes Care* 2009;32(4):677-679.
56. Feve B, Bastard JP. The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2009;5(6):305 - 311.

57. Ghosh S, Collier A, Hair M, Malik I, Elhaad T. Metabolic syndrome in type 1 diabetes. *Int J Diab Mell* 2010; 2:38-42.
58. Wild SH, Byrne CD. *The Global Burden of the Metabolic Syndrome and its Consequences for Diabetes and Cardiovascular Diseases*. U: Byrne CD, Wild SH. *The Metabolic Syndrome*. Wiley 2005; 1-41.
59. Duvnjak L, Duvnjak M. The metabolic syndrome—an ongoing story. *J Physiol Pharmacol* 2009;60(Suppl. 7):19–24.
60. Jiamsripong P, Mookadam M, Honda T, Khandheria BK, Mookadam F. The Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease: Part I. *Prev Cardiol*. 2008; 11: 155–161.
61. Božikov V. Metabolički sindrom – povijesne napomene. *Medicus* 2004; 13(2): 5–8.
62. International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome; 2009. <http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf> pristupljeno Aug 10th 2015.
63. Orchard TJ, Chang YF, Ferrell RE, Petro N, Ellis DE. Nephropathy in type 1 diabetes: a manifestation of insulin resistance and multiple genetic susceptibilities? *Kidney Int* 2002; 62 : 963–970.
64. Orchard TJ, Olson JC, Erbey JR, Williams K, Forrest KYZ, Kinder LS, et al. Insulin resistance-related factors, but not glycemia, predict coronary artery disease in type 1 diabetes: 10-year follow-up data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications study *Diab Care*, 26 (2003), pp. 1374–1379
65. Smith U, Yang X. Adipocytokines and the Pathogenesis of the Metabolic Syndrome. In: Byrne CD, Wild SH, editors. *The Metabolic Syndrome*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.; 2005; 239–262.
66. Dyck DJ, Heigenhauser GJ, Bruce CR. The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *Acta Physiol*. 2006; 186(1): 5–16.
67. Lamers D, Famulla S, Wronkowitz N, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes* 2011; 60(7):1917–25.
68. Van der Veken P, Haemers A, Augustyns K. Prolyl peptidases related to dipeptidyl peptidase IV: potential of specific inhibitors in drug discovery. *Curr Topics Med Chem* 2007;7:621-35.
69. Matteucci E, Giampietro O. Dipeptidyl peptidase-4 (CD26): knowing the function before inhibiting the enzyme. *Curr Med Chem* 2009;16:2943-51.
70. Vanderheyden M, Bartunek J, Goethals M, Verstreken S, Lambeir AM, De Meester I, Scharpé S. Dipeptidyl-peptidase IV and B-type natriuretic peptide. From bench to bedside.

Clin Chem Lab Med 2009;47:248-52.

71. Lambeir AM., Durinx C, Scharpe S and De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. Crit Rev Clin Lab Sci 2003; 40, 209-294.

72. Boonacker E, Van Noorden CJ. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. Eur J Cell Biol 2003;82:53-73.

73. Wang XM, Yu DM, McCaughan GW, Gorrell MD. Extraenzymatic roles of DPPIV and FAP in cell adhesion and migration on collagen and fibronectin. Adv Exp Med Biol 2006;575:213-22.

74. Martinez-Navio JM, Climent N, Pacheco R, Garcia F, Plana M, Nomdedeu M, Oliva H, Rovira C, Miralles L, Gatell JM, Gallart T, Mallol J, Lluís C, Franco R. Immunological dysfunction in HIV-1-infected individuals caused by impairment of adenosine deaminase-induced costimulation of T-cell activation. Immunology 2009;128:393-404.

75. Pang R, Law WL, Chu AC, Poon JT, Lam CS, Chow AK, Ng L, Cheung LW, Lan XR, Lan HY, Tan VP, Yau TC, Poon RT, Wong BC. A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. Cell Stem Cell 2010;6:603-15

76. Liu Z, Christensson M, Forslöw A, De Meester I, Sundqvist KG. A CD26-controlled cell surface cascade for regulation of T cell motility and chemokine signals. J Immunol 2009;183:3616-24.

77. Ansorge S, Bank U, Heimburg A, Helmuth M, Koch G, Tadge J, Lendeckel U, Wolke C, Neubert K, Faust J, Fuchs P, Reinhold D, Thielitz A, Täger M. Recent insights into the role of dipeptidyl aminopeptidase IV (DPIV) and aminopeptidase N (APN) families in immune functions. Clin Chem Lab Med 2009;47:253-61.

78. Reinhold D, Gohl A, Wrenger S, Reinhold A, Kühlmann UC, Faust J, Neubert K, Thielitz A, Brocke S, Täger M, Ansorge S, Bank U. Review: Role of dipeptidyl peptidase IV (DP IV)-like enzymes in T lymphocyte activation: investigations in DP IV/CD26-knockout mice. Clin Chem Lab Med 2009;47:268-74.

79. Thompson MA, Ohnuma K, Abe M, Morimoto C, Dang NH. CD26/dipeptidyl peptidase IV as a novel therapeutic target for cancer and immune disorders. Mini Rev Med Chem 2007;7:253-73.

80. Aytac U, Dang NH. CD26/dipeptidyl peptidase IV: a regulator of immune function and a potential molecular target for therapy. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 2004;4:11-8.

81. Yazbeck R, Howarth GS, Abbott CA. Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? *Trends Pharmacol Sci* 2009;30:600-7.
82. Varga T, Somogyi A, Barna G, Wichmann B, Nagy G, et al. Higher serum DPP-4 enzyme activity and decreased lymphocyte CD26 expression in type 1 diabetes. *Pathol Oncol Res* 2011; 17:925-30.
83. Ahrén B. GLP-1-based therapy of type 2 diabetes: GLP-1 mimetics and DPP-IV inhibitors. *Curr Diab Rep* 2007;7:340-7.
84. Blonde L. Current antihyperglycemic treatment strategies for patients with type 2 diabetes mellitus. *Cleve Clin J Med* 2009;76(Suppl 5):S4-11.
85. Campbell RK, Neumiller JJ, White J, Sisson E, Kuhn C. Type 2 diabetes: epidemiology and treatment, pathophysiology new therapeutics, and the evolving role of the pharmacist. *J Am Pharm Assoc* 2009;49(Suppl 1):S2.
86. Palalau AI, Tahrani AA, Piya MK, Barnett AH. DPP-4 inhibitors in clinical practice. *Postgrad Med* 2009;121:70-100.
87. Osawa S, Kawamori D, Katakami N et al. Significant Elevation of Serum Dipeptidyl Peptidase-4 Activity in Young-adult Type 1 Diabetes. *Diab Res and Clin Pract*, Available online 14 January 2016, ISSN 0168-8227, <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2015.12.022>. *Pristupljeno Jan 1st 2016*.
88. De Meester, I., Durinx, C., Bal, G., Proost, P., Struyf, S., Goossens, F., Augustyns, K., and Scharpe, S. Natural substrates of dipeptidyl peptidase IV. *Adv.Exp.Med.Biol.* 2000: 477, 67-87.
89. Mulvihill EE and Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *End Rev* 2014, 35: 992–1019.
90. Mannucci E, Pala L, Ciani S et al. Hyperglycaemia increases dipeptidyl peptidase IV activity in diabetes mellitus. *Diabetol* 2005 (48): 1168–1172, 2005.
91. Ryskjær J, Deacon CF, Carr RD et al. Plasma dipeptidyl peptidase-IV activity in patients with type-2 diabetes mellitus correlates positively with HbA1c levels, but is not acutely affected by food intake. *EJE*; 2006; 155(3): 485–493.
92. McKillop AM, Duffy NA, Lindsay JR, O'Harte FPM, Bell PM, and Flatt PR. Decreased dipeptidyl peptidase-IV activity and glucagon-like peptide-1(7–36)amide degradation in type 2 diabetic subjects. *Diab Res Clin Pract* 2008; 79(1): 79–85.
93. Lenhard JM, Croom DK, and Minnick DT. Reduced serum dipeptidyl peptidase-IV after metformin and pioglitazone treatments. *Bioch Biophys Res Comm* 2004; 324(1): 92–97.

94. Lindsay JR, Duffy NA, McKillop MA et al. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV activity by oral metformin in type 2 diabetes. *Diabet Med*;2009: 654–657.
95. Lupi R, Del Guerra S, D'Aleo V, Boggi U, Filipponi F, Marchetti P. The direct effects of GLP-1 and GIP, alone or in combination, on human pancreatic islets. *Regul Pept* 2010;165:129-32.
96. Firneisz G, Varga T, Lengyel G, et al. Serum dipeptidyl peptidase-4 activity in insulin resistant patients with non-alcoholic fatty liver disease: a novel liver disease biomarker. *PLoS One* 2010;5(8):e12226.
97. Kusunoki M, Sato D, Nakamura T et al. The Beneficial Effects of the DPP-4 Inhibitor Alogliptin on Hemoglobin A1c and Serum Lipids in Japanese Patients with Type 2 Diabetes. *Drug Res (Stuttg)*. 2016;66(1):18-22.
98. Llauradó G, Sevastianova K, Sädevirta S, Hakkarainen A, Lundbom N, Orho-Melander M, Groop PH, Forsblom C, Yki-Järvinen H. Liver fat content and hepatic insulin sensitivity in overweight patients with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(2):607-16
- 99.
99. Sun AL, Deng JT, Guan GJ et al.. Dipeptidyl peptidase-IV is a potential molecular biomarker in diabetic kidney disease. *Diab Vasc Dis Res* 2012;9(4):301-8.
100. Williams KV, Erbey JR, Becker D, Arsianian S, Orchard TJ. Can clinical factors estimate insulin resistance in type 1 diabetes? *Diabetes* 2000; 49:626-32.
101. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, 3rd, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009;150(9):604-12.
102. Čelić M, Dorn V. Dijagnostika ambliopije. U: Čelić M, Dorn V (ed.) *Strabizam i nistagmus*. Zagreb, Medicinska naklada, 2004: 278-281.
103. European glaucoma society. Patient examination: Intraocular pressure (IOP). U: *Terminology and guidelines for glaucoma*. Savona, Editrice Dogma S.r.l., 2008:61-66.
104. Friberg TR. Examination of the retina: ophthalmoscopy and fundus biomicroscopy. U: Albert DM, Jakobiec FA (ed.) *Principles and practice of ophthalmology*. 2nd edn. Philadelphia, Saunders, 2000:1820-1830.
105. Aldington SJ, Kohner EM, Meuer S, Klein R, Sjolie AK. Methodology for retinal photography and assessment of diabetic retinopathy: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia* 1995; 38: 437-444.
106. Taylor BV DP. Clasification of the diabetic neuropathies. U: Dyck PJ, Thomas PK (ed.) *Diabetic neuropathy* 2nd edn. WBSunders Company. 1999:407-14.
107. PJ D. Neuropathy Impairment Score. *Neurology*. 1995;45:1115-21.

108. Association AD. Consensus statement: standardized measures in diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1995;18 (Suppl 1):59-82
109. Ewing DJ, Campbell IW, Clarke BF. Assessment of cardiovascular effects in diabetic autonomic neuropathy and prognostic implications. *Ann Intern Med* 1980; 92:308-311.
110. Kastorini CM, Panagiotakos DB, Georgousopoulou EN et al. Metabolic syndrome and 10-year cardiovascular disease incidence: The ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015 Dec 23. pii: S0939-4753(15)30152-6. doi: 10.1016/j.numecd.2015.12.010. [Epub ahead of print]
111. Dearborn JL, Schneider AL, Sharrett AR et al. Obesity, Insulin Resistance, and Incident Small Vessel Disease on Magnetic Resonance Imaging: Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Stroke*. 2015;46(11):3131-6
112. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2012; 287: 356-9.
113. Gaggini M, Saponaro C, Gastaldelli A. Not all fats are created equal: adipose vs. ectopic fat, implication in cardiometabolic diseases. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2015 Apr;22(1):7-18.
114. Lalia AZ, Dasari S, Johnson ML et al. Predictors of whole-body insulin sensitivity across ages and adiposity in adult humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Dec 28;jc20152892. [Epub ahead of print]
115. Flakoll PJ, Jensen MD, Cherrington AD. Physiological action of insulin. U: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, (ur.) *Diabetes Mellitus: A fundamental and clinical text*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2004, p. 165-81.
116. Wu CF, Liu PY, Wu TJ, Hung Y, Yang SP, Lin GM. Therapeutic modification of arterial stiffness: An update and comprehensive review. *World J Cardiol*. 2015;7(11):742-53.
117. Cosenso-Martin LN, Giollo-Júnior LT, Martineli DD, Cesarino CB, Nakazone MA, Cipullo JP, Vilela-Martin JF. Twelve-week randomized study to compare the effect of vildagliptin vs. glibenclamide both added-on to metformin on endothelium function in patients with type 2 diabetes and hypertension. *Diabetol Metab Syndr*. 2015;7:70. doi: 10.1186/s13098-015-0062-z. eCollection 2015.
118. Kröller-Schön S, Knorr M et al., 2012. Glucose-independent improvement of vascular dysfunction in experimental sepsis by dipeptidyl-peptidase 4 inhibition. *Cardiovasc Res*. 96:140–149.

119. Liu L, Liu J, Wong WT et al., 2012. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor sitagliptin protects endothelial function in hypertension through a glucagon-like peptide 1-dependent mechanism. *Hypertension*. 60:833–841.
120. Torres G, Morales PE, García-Miguel M, Norambuena-Soto I, Cartes-Saavedra B, Vidal-Peña G, Moncada-Ruff D, Sanhueza-Olivares F, Martín AS, Chiong M. Glucagon-like peptide-1 inhibits vascular smooth muscle cell dedifferentiation through mitochondrial dynamics regulation. *Biochem Pharmacol*. 2016 Jan 22. pii: S0006-2952(16)00037-X. doi: 10.1016/j.bcp.2016.01.013. [Epub ahead of print]
121. Mason PR, Jacob R, Corbalan JJ, Kubant R, Ciszewski A, Malinski T, 2012. Effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibition on endothelial nitric oxide release, blood pressure and SICAM-1 levels in hypertensive rats. *JACC*. 59(13): E1543.
122. Poirer P, Despres JP. Lipid disorders in diabetes. U: Pickup JC, Williams G, (ur.) *Textbook of diabetes*. 3. izd. Malden, Mass.: Blackwell Science; 2003, str. 54.1-54.21.
123. Taskinen MR. Diabetic dyslipidemia. *Atherosclerosis Supplements* 2002;3:47-51.
124. Aroor AR, Habibi J, Ford Daet al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition ameliorates Western diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance through hepatic lipid remodeling and modulation of hepatic mitochondrial function. *Diabetes*. 2015;64(6):1988-2001.
125. McGill M, Molyneaux L, Twigg SM, Yue DK. The metabolic syndrome in type 1 diabetes: does it exist and does it matter? *J Diabetes Complications*. 2008 Jan-Feb;22(1):18-23.
126. Fong DS, Aiello L, Gardner TW, et al; American Diabetes Association. Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(Suppl 1):S84-7.
127. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet*. 2010;376:124-36.
128. LeCaire TJ, Palta M, Klein R, Klein BE, Cruickshanks KJ. Assessing progress in retinopathy outcomes in type 1 diabetes: comparing findings from the Wisconsin Diabetes Registry Study and the Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care*. 2013;36:631-7.
129. Hoffman RP, Dye AS, Huang H, Bauer JA. Effects of glucose control and variability on endothelial function and repair in adolescents with type 1 diabetes. *ISRN Endocrinol*. 2013;2013:876547.
130. Fadini GP, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Significance of endothelial progenitor cells in subjects with diabetes. *Diabetes Care*. 2007;30:1305-13.
131. Fadini GP, Sartore S, Schiavon M, et al. Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats. *Diabetologia*. 2006;49:3075-84.

132. Berndt-Zipfel C, Michelson G, Dworak M, Mitry M, Löffler A, Pfützner A, Forst T. Vildagliptin in addition to metformin improves retinal blood flow and erythrocyte deformability in patients with type 2 diabetes mellitus: results from an exploratory study. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;8:59.
133. Ott C, Raff U, Schmidt S, et al. Effects of saxagliptin on early microvascular changes in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:19.
134. von Websky K, Reichetzedler C, Hoher B. Linagliptin as add on therapy to insulin for patients with type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag*. 2013;9:681-94.
135. Hernández C, Bogdanov P, Corraliza L i sur. Topical Administration of GLP-1 Receptor Agonists Prevents Retinal Neurodegeneration in Experimental Diabetes. *Diabetes*. 2016 Jan;65(1):172-87.
136. Fowler MJ. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*. 2008; 26 (2) 77-82.
137. Newman DJ, Mattock MB, Dawnay AB i sur. Systematic review on urine albumin testing for early detection of diabetic complications. *Health Technol Assess*. 2005;9(30):iii-vi, xiii-163.
138. Alwakeel JS, Al-Suwaida A, Isnani AC, Al-Harbi A, Alam A. Concomitant macro and microvascular complications in diabetic nephropathy. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2009;20(3):402-9.
139. Makino Y, Fujita Y, Haneda M. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in progressive kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015;24(1):67-73.
140. Liu WJ, Xie SH, Liu YN i sur. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor attenuates kidney injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;340(2):248-55.
141. Higashijima Y, Tanaka T, Yamaguchi J, Tanaka S, Nangaku M. Anti-inflammatory role of DPP-4 inhibitors in a nondiabetic model of glomerular injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015;308(8):F878-87.
142. Matsui T, Nakashima S, Nishino Y i sur. Dipeptidyl peptidase-4 deficiency protects against experimental diabetic nephropathy partly by blocking the advanced glycation end products-receptor axis. *Lab Invest*. 2015;95(5):525-33.
143. Duvnjak L, Vučković S, Car N, Metelko Z. Relationship between autonomic function, 24-h blood pressure, and albuminuria in normotensive, normoalbuminuric persons with Type 1 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2001;15(6):314-9.
144. Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008; 4: 444-52.

145. Shaw JE, Zimmet PZ, Gries FA, Ziegler D. Epidemiology of diabetic neuropathy. U: Gries FA, Cameron NE, Low PhA, Ziegler D (ed.) Textbook of diabetic neuropathy. Stuttgart, Thieme, 2003; 64-79.
146. Vinik AI, Erbas T, Casellini CM. Diabetic cardiac autonomic neuropathy, inflammations and cardiovascular disease. *J Diabetes Investigat* 2013;4:4–18.
147. Frerker N, Raber K, Bode i sur. Phenotyping of congenic dipeptidyl peptidase 4 (DP4) deficient Dark Agouti (DA) rats suggests involvement of DP4 in neuro-, endocrine, and immune functions. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(3):275-87.
148. Jin HY, Liu WJ, Park JH, Baek HS, Park TS. Effect of dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) inhibitor (Vildagliptin) on peripheral nerves in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Med Res.* 2009;40(7):536-44.
149. Yagihashi S, Yamagishi S-I, Wada R. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: Correlation with clinical signs and symptoms. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 77S: 184-189
150. Mu ZP, Wang YG, Li CQ i sur. Association Between Tumor Necrosis Factor- α and Diabetic Peripheral Neuropathy in Patients with Type 2 Diabetes: a Meta-Analysis. *Mol Neurobiol.* 2016 Jan 21. [Epub ahead of print]
151. Mavropoulos, J.C., Cuchacovich, M., Llanos, C., Aguillón, J.C., Gatica, H., Pizzo, S.V., Gonzalez-Gronow, M. Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy augments dipeptidyl peptidase IV activity and decreases autoantibodies to GRP78/BIP and phosphoglucose isomerase in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2005; 32(11):2116-24.
152. Tannus LR, Drummond KR, Clemente EL, da Matta Mde F, Gomes MB; Brazilian Type 1 Diabetes Study Group (BrazDiab1SG). Predictors of cardiovascular autonomic neuropathy in persons with type 1 diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014 Nov 25;5:191. doi: 10.3389/fendo.2014.00191. eCollection 2014.
153. Spallone V, Ziegler D, Freeman R, Bernardi L, Frontoni S, Pop-Busui R, Stevens M, Kempler P, Hilsted J, Tesfaye S, Low P, Valensi P on behalf of the Toronto Panel on Diabetic Neuropathy. Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: clinical impact, assessment, diagnosis, and management. *Diabetes Metab Res Rev* 2011; 27:639-653.
154. Frontoni S, Pellegrinotti M, Bracaglia D i sur. Hyperinsulinemia in offspring of type 2 diabetic patients: impaired response of carbohydrate metabolism, but preserved cardiovascular response. *Diabet Med.* 2000; 17: 606–1.

155. Torffvit O, Lindqvist A, Agardh CD, Pahlm O. The association between diabetic nephropathy and autonomic nerve function in type 1 diabetic persons. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 1997; 57:183-191.

11. ŽIVOTOPIS

Kristina Blaslov rođena je 9. lipnja 1988. godine u Zadru gdje završava osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje. 2012. godine diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Bila je aktivni član Međunarodne organizacije studenata medicine (CroMSIC) gdje je pokrenula projekt “Pirmarna prevencija šećerne bolesti tip 2 usmjerene na mlađu dobdnu skupinu”, a javnozdravstvenu aktivnost nastavlja iste godine pri Hrvatskom savezu dijabetičkih udruga. 2013. godine kao pripravnik KB Merkur položila je državni stručni ispit. Od 2013.-2016. polazi doktorski studij pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2015. godine je zaposlena kao specijalizantica endokrinologije i dijabetologije u Sveučilišnoj klinici Vuk Vrhovac gdje aktivno sudjeluje u znanstvenom istraživanju patofiziologije inzulinske rezistencije i mikrovaskularnih komplikacija šećerne bolesti. Autorica i koautorica je 37 znanstvenih i stručnih radova od koji je 23 objavljeno u časopisima indeksiranim u bazi Current Contents te brojnih kongresnih priopćenja.