CINK I B1-PROTEIN GRUPE VISOKE MOBILNOSTI U DJECE SA ŠEĆERNOM BOLESTI TIPA 1

Marjanac, Igor

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:664120

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Igor Marjanac

CINK I B1-PROTEIN GRUPE VISOKE MOBILNOSTI U DJECE SA ŠEĆERNOM BOLESTI TIPA 1

Doktorska disertacija

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Igor Marjanac

CINK I B1-PROTEIN GRUPE VISOKE MOBILNOSTI U DJECE SA ŠEĆERNOM BOLESTI TIPA 1

Doktorska disertacija

Osijek, 2018.

Doktorska je disertacija ostvarena u:
Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; Medicinskom fakultetu Osijek;
Kliničkom bolničkom centru Osijek

Mentor:
prof. dr. sc. Jerko Barbić, dr. med.

Rad ima 137 listova.

ZAHVALA

Zahvaljujem svome mentoru prof. dr. sc. Jerku Barbiću, dr. med. na nesebičnoj pomoći i potpori te dragocjenim uputama i savjetima koji su bili potrebni za istraživanje i izradu doktorske disertacije. Osobita zahvala prijatelju i kolegi doc. dr. sc. Robertu Lovriću na nesebičnoj pomoći i strpljenju koje je pokazao i bez kojega bi bilo gotovo nemoguće dovršiti ovaj rad. Također zahvaljujem kolegama s odjela Klinike za pedijatriju te medicinskoj sestri Sandri Hranić koja je pomogla da ovaj rad ugleda svjetlo dana.

Zahvaljujem kolegicama liječnicama doc. dr. sc. Silviji Varžič-Canecki, dr. med. Aniti Matić i dr. med. Lidiji Barić na sugestijama i podršci koju su pokazale u izradi ovoga rada.

Zahvaljujem osoblju Laboratorija Kliničkog bolničkog centra Osijek, osobito doc. dr. sc. Sanji Mandić, mr. sc. Jasni Paveli i kolegama s Medicinskog fakulteta J. J. Strosmayera u Osijeku koji su mi omogućili izvođenje eksperimentalnog dijela istraživanja.

Hvala supruzi Neveni, sinovima Karlu i Matku te majci, sestri i prijateljima za strpljenje, razumijevanje i pomoć pri studiranju, istraživanju i izradi doktorske disertacije.
Doktorsku disertaciju posvećujem svojemu ocu.

Igor Marjanac, dr. med.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Smisao predložene teme 1

1.2. ŠEĆERNA BOLEST 2

1.2.1. Definicija i opis. 2

1.2.2. Kriteriji za dijagnozu 3

1.3. ŠEĆERNA BOLEST TIP 1 3

1.3.1. Epidemiologija šećerne bolesti tipa 1 4

1.3.2. Čimbenici rizika za razvitak šećerne bolesti tip 1. 6

1.3.2.1. Dob 6

1.3.2.2. Spol. 6

1.3.2.3. Rasna i etnička pripadnost 6

1.3.2.4. Genetski čimbenici. 7

1.3.2.5. Sezonska pojavnost. 8

1.3.2.6. Okolišni čimbenici. 9

1.4. KLINIČKI TIJEK, LIJEČENJE I KOMPLIKACIJE ŠEĆERNE BOLESTI TIPA 1 10

1.4.1. Patozifiološki mehanizmi u razvoju šećerne bolesti tipa 1 10

1.4.2. Klinički tijek i stadiji bolesti 10

1.4.3. Terapijski pristup 11

1.4.4. Učestalost komplikacija 12

1.5. PATOGENETSKI MEHANIZAM RAZVOJA ŠEĆERNE BOLESTI TIPA 1 13

1.5.1. Higijenska hipoteza 13

1.5.2. Interakcija imunosnog sustava i crijevne flore 14

1.5.3. Inzulitis 16

1.5.3.1. Povijest istraživanja inzulitisa 17

1.5.3.2. Inzulitis u predkliničkom stadiju. 18

1.5.3.3. Uloga proupalnih čimbenika u razvoju inzulitisa 19

1.5.3.4. Pomoćnički T-limfociti u šećernoj bolesti tipa 1. 20

1.5.3.5. Uloga Th17 citokina u šećernoj bolesti tipa 1..... 20

1.5.3.6. Uloga Th17 stanica u šećernoj bolesti tipa 1. 21

1.5.3.7. Interakcija Th17 i Treg stanica u šećernoj bolesti tipa 1. 22

1.5.3.8. Interakcija crijevne flore i Th17/Treg stanica u šećernoj bolesti tipa 1. 22

1.5.3.9. Nove terapijske mogućnosti u liječenju šećerne bolesti tipa 1. 23

1.5.4. Citokini 24

1.5.5. Alarmini 26

1.5.5.1. Alarmini u patogenezi autoimunih bolesti 27

1.5.5.2. Protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1). 30

1.5.5.3. Struktura HMGB1. 30

1.5.5.4. Funkcije HMGB1. 31

1.5.5.5. Unutarstanične funkcije HMGB1. 32

1.5.5.6. Stanično izlučivanje HMGB1. 33

1.5.5.7. Izvanstanične funkcije HMGB1. 34

1.5.5.8. Metode mjerenja HMGB1. 35

1.5.5.9. Uloga i klinička važnost HMGB1 u autoimunih bolesti 36

1.6. ULOGA MIKRONUTRIJENATA/ ELEKTROLITA U RAZVOJU ŠEĆERNE BOLESTI TIPA 1 38

1.6.1. Cink. 38

1.6.1.1. Cink i upala. 40

1.6.2. Magnezij 41

1.6.2.1. Magnezij i upala. 42

2. HIPOTEZE 44

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 45

4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA 46

4.1. Ustroj istraživanja 46

4.2. Ispitanici 46
4.3. Metode 48
4.3.1. Protokol ispitivanja 48
4.3.2. Anamneza i pregled medicinske dokumentacije 49
4.3.3. Klinički i antropometrijski podatci 50
4.3.4. Biološke analize 51
4.3.5. Statistička obrada podataka 55
4.3.6. Osobine ispitanika 56
5. REZULTATI 57
5.1. Opća i klinička obilježja ispitanika 57
5.2. Razlike u biokemijskim vrijednostima između skupina 63
5.3. Vrijednosti biokemijskih parametara kod ispitanika eksperimentalne skupine 70
5.4. Odnos cinka i HMGB1 s ostalim parametrima. 88
5.5. Odnos magnezija i ostalih parametara 91
5.6. Antigeni HLA. 92
5.7. Protutijela na β-stanice 94
6. RASPRAVA. 98
6.1. Upala u šećernoj bolesti tipa 1. 98
6.2. Značaj cinka u razvitku šećerne bolesti tipa 1. 99
6.3. Značaj magnezija u razvitku šećerne bolesti tipa 1. 100
6.4. Utjecaj alarmina HMGB1 na razvitak šećerne bolesti tipa 1. 100
7. ZAKLJUČCI 104
8. SAŽETAK. 105
9. SUMMARY 106
10. LITERATURA. 107
11. ŽIVOTOPIS 133

Popis kratica

ADA Američko dijabetološko udruženje, od engl. *American Diabetes Association*

ALT alanin aminotransferaza

APC antigen predočna stanica, od engl. *antigen presenting cell*

AST aspartat aminotransferaza

CRP C-reaktivni protein

DAMPs opasnošću povezani molekularni obrasci, od engl. *Damage associated molecular patterns*

DC dendritičke stanice, od engl. *Dendritic cells*

ELISA enzimski imunotest, od engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*

ESPE Europsko pedijatrijsko endokrinološko udruženje od engl. *European society of pediatric endocrinology*

Fe željezo

FT3 slobodni trijodtironin, od engl. *free threeiodothyronine*

FT4 slobodni tieroksin, od engl. *free tiroxine*

GAD protutijela na dekarboksilazu glutaminske kiseline, od engl. *glutamic acid decarboxylase*

GUP glukoza u plazmi

GUK glukoza u krvi

HbA1c glikolizirani hemoglobin A1c

HDL lipoproteini visoke gustoće, od engl. *High density lipoproteins*

HLA glavni kompleks gena tkivne podudarnosti, od engl. *human leukocyte antigens receptor*

HMGB1 B1-protein grupe visoke mobilnosti, od engl.*High mobility group box 1 protein*

HSPs proteini toplinskoga šoka, od engl. *heat shock proteins*

IDF Međunarodno dijabetološko udruženje, od engl. *International Diabetes Federation*

IA-2 protutijela na endogeni inzulin, od engl. *tyrosine phosphatase-like insulinoma antigen 2*

ICA protutijela na Langerhansove otočiće, od engl. *islet cell autoantigen*

IFG oštećenje glikemije natašte

IGF-1 inzulinu sličan čimbenik rasta

IL-1 interleukin 1

IL-6 interleukin 6

IL-10 interleukin 10

ISPAD	Međunarodno udruženje za dijabetes djece i adolescenata, od engl. *International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes*
ITM	indeks tjelesne mase
L	leukociti
LDL	lipoproteini niske gustoće, od engl. *low density lipoproteins*
Mg	magnezij
MHC	glavni kompleks gena tkivne podudarnosti u miša, od engl. *main histocompatibility complex*
OGTT	oralni test opterećenja glukozom, od engl. *oral glucose tolerance test*
PAMPs	patogenima povezani molekularni obrasci, od engl. *Pathogen-associated molecular pattern*
PCR	kvantitativna lančana reakcija polimerazom, od engl. *Pathogen-polymerase chain reaction*
PRP	receptor za prepoznavanje patogena, od engl. *Pathogen-recognition receptors*
PRR	receptor za prepoznavanje strukturnih „predložaka–, od engl. *Patern recognition receptor*
RAGE	receptor za krajnje produkte uznapredovale glikacije, od engl. *receptor for advanced glycation end products*
RIA	radio-imuno esej, od engl. *radio immuno assay*
ROS	reaktivni metaboliti kisika, od engl. *reactive oxygen species*
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
TLR	tolu-sličan receptor, od engl. *Toll like receptor*
TGF-β	transformirajući čimbenik rasta beta, od engl. *Transforming growth factor beta*
TNF-α	čimbenik nekroze tumora alfa, od engl. *tumor necrosis factor alfa*
Treg	regulacijski T-limfociti
TSH	tireostimulirajući hormon
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija, od engl. *World Health Organisation*
Zn	cink
ZnT8	autoantitijela na β-stanični specifični cink transporter 8, od engl. *zinc transporter 8*

1. UVOD

1.1. Smisao predložene teme

Šećerna je bolest metabolički poremećaj višestruke etiologije čije je glavno obilježje stanje kronično povišene razine glukoze u krvi. Kronične nezarazne bolesti u koje ubrajamo i šećernu bolest tipa 1 u djece su u stalnom i dramatičnom porastu u cijelom svijetu. Promjene su osobito naglašene u razvijenim te srednje razvijenim zemljama, uz tendenciju sve većeg porasta i u nerazvijenim zemljama, osobito u mlađih dobnih skupina. Nagli porast prevalencije tipa 1 šećerne bolesti u djece unatrag dva desetljeća povezuje se u prvom redu s utjecajem okolišnih čimbenika, no do razvitka tipa 1 šećerne bolesti najvjerojatnije dolazi u složenom međudjelovanju okolišnih čimbenika i genetske predispozicije (1). Temeljni patofiziološki poremećaj u tipu 1 šećerne bolesti predstavlja manjak inzulina zbog oštećenja funkcije β-stanica Langerhansovih otočića gušterače. Patofiziološki mehanizam kojim započinje ovo oštećenje, međutim, nije još u potpunosti poznat. Objašnjenje patogeneze šećerne bolesti tipa 1 hipotezom moguće aktivacije sustava urođene imunosti putem kontinuiranog autoimunog procesa na Langeharsovim otočićima gušterače bitno je u razjašnjavanju nastanka ove bolesti (2). Niz istraživanja pokušava dokazati da cirkulirajući markeri upale, proteini akutne faze, među njima citokini i alarmini, mogu biti prediktori razvitka šećerne bolesti tipa 1 (3). Aktivacija sustava urođene imunosti, kao mogući patogenetski mehanizam za razvitak šećerne bolesti, predstavlja novi model kojim se može objasniti nastanak bolesti i kroničnih komplikacija (4). Histologiju Langerhansovih otočića u oboljelih od tipa 1 šećerne bolesti karakterizira upalni proces uz nazočnost citokina, apoptoze stanica i infiltracije imunim stanicama (5).

Čimbenici rizika koji mogu utjecati na aktivaciju, odnosno intenzitet aktivacije sustava urođene imunosti, mogu biti egzogene, odnosno endogene prirode. Jedni od endogenih čimbenika rizika mogli bi biti specifični proupalni citokini u koje svrstavamo i endogens signalne molekule opasnosti, znane kao alarmin, te HMGB1. Alarmini su mali topljivi proteini ili glikoproteini proizvedeni od jedne vrste stanica s učinkom na promjenu ponašanja druge vrste stanica. Proizvodi ih čitav niz različitih stanica i neophodni su za razvitak i funkcioniranje urođenog i stečenog imunološkog odgovora. Učinak na ciljnim stanicama ostvaruju vežući se na specifične receptore (6). Uloga niza citokina i alarmina u patogenezi šećerne bolesti još je uvijek predmetom ispitivanja, no disregulacija se može povezati s nastankom i razvitkom šećerne bolesti tipa 1. Neravnoteža između aktivnosti proupalnih

citokina i alarmina, kojima pripadaju HMGB1, S100, TNF-α, IL-1 i IL-6, i s druge strane onih s protuupalnim učinkom, poput IL-10 i TGF-β, može dovesti do razvoja početne upale, što se histološki menifestira slikom inzulitisa. Smatra se da u genetski predisponiranih osoba za razvoj autoimuna dijabetesa hipersekrecija citokina s proupalnim učinkom može uzrokovati nastanak inzulitisa i posljedično dovesti do manifestne šećerne bolesti tipa 1. U prilog tome govore i nedavna istraživanja na životinjskim modelima koja su pokazala da se blokiranjem aktivnosti pojednih proupalnih citokina i alarmina može usporiti, ili čak i zaustaviti razvitak i napredovanje inzulitisa i manifestne šećerne bolesti tipa 1 (7). Protuupalni citokini mogu ovaj učinak smanjiti, odnosno neutralizirati. Specifični vanjski čimbenici koji mogu dovesti do hipersekrecije proupalnih ili neravnoteže proupalnih i protuupalnih citokina i alarmina do danas nisu poznati, no predmet su intenzivna istraživanja. U svrhu daljnjeg rasvjetljavanja točnog patogenetskog mehanizma ovoga složenog procesa i otkrivanja mogućeg utjecaja vanjskih čimbenika, cilj je ovoga rada bio pokazati mogući učinak razine serumskog cinka i dokaz povišene razine proupalnog čimbenika HMBG1 u nastanku šećerne bolesti tipa 1 u djece.

1.2. ŠEĆERNA BOLEST

1.2.1. Definicija i opis

Šećerna bolest (nadalje ŠB) kompleksna je, multifaktorijalna i poligenska kronična metabolička bolest karakterizirana poremećajem metabolizma ugljikohidrata, masti i bjelančevina uzrokovana relativnim ili apsolutnim nedostatkom inzulina, poremećajem inzulinskog djelovanja ili kombinacijom tih dvaju mehanizama. Šećerna bolest dovodi do niza akutnih komplikacija kao što su dijabetička ketoacidoza, neketotična hiperosmolarna koma te hipoglikemija, ali i do razvitka niza kroničnih komplikacija krvožilnog sustava koje mogu biti mikrovaskularne (retinopatija, nefropatija i polineuropatija) i makrovaskularne (koronarna bolest, cerebrovaskularna bolest i periferna arterijska bolest) (8). Etiološki se šećerna bolest dijeli na tip 1, kojemu je u podlozi razaranje β-stanica gušterače, što dovodi do apsolutnog nedostatka inzulina; tip 2, koji može varirati od inzulinske rezistencije s relativnim nedostatkom inzulina do poremećaja lučenja s inzulinskom rezistencijom ili bez nje; druge specifične tipove koji u podlozi imaju različite sindrome, genetske poremećaje ili su posljedica djelovanja egzogenih štetnih tvari i gestacijski dijabetes kao posebnu kategoriju koja se javlja u trudnica.

1.2.2. Kriteriji za dijagnozu

Kriteriji za postavljanje dijagnoze ŠB-a temelje se na koncentraciji glukoze u krvi i prisutnosti ili odsutnosti simptoma bolesti. Simptomi hiperglikemije su poliurija, polidipsija, polifagija uz gubitak težine, ponekad i zamagljen vid, zastoj rasta i osjetljivost na određene infekcije. Akutne, za život opasne posljedice nekontroliranog dijabetesa su hiperglikemija s ketoacidozom ili sindrom neketotske hiperosmolalne kome.

Danas su važeći kriteriji za dijagnozu šećerne bolesti prema preporukama ISPAD-a:

- klasični simptomi dijabetesa ili hiperglikemijska kriza s vrijednosti glukoze u plazmi (GUP) ≥ 11,1 mmol/L
- GUP natašte ≥ 7,0 mmol/L (natašte je stanje definirano izostankom kalorijskog unosa kroz najmanje 8 sati)
- GUP u 120 minuta tijekom oralnog testa opterećenja glukozom (OGTT-a) ≥ 11,1 mmol/L (OGTT treba biti učinjen prema preporukama WHO-a, koristeći opterećenje ekvivalentno 75 g dehidrirane glukoze otopljene u vodi ili 1,75 g/kg glukoze prema tjelesnoj težini ispitanika do maksimalno 75 g)
- HbA1c ≥ 6,5 % (Test treba biti učinjen u laboratoriju koji koristi metodu certificiranu od strane NGSP-a (Nacionalni program za standardizaciju glikoziliranog hemoglobina, skraćeno od engl. *National Glycohemoglobin Standardization Program*) i standardiziranu prema DCCT eseju (Studija kontrole dijabetesa i komplikacija, skraćeno od engl. *Diabetes Control and Complications Trial*)).

1.3. ŠEĆERNA BOLEST TIP 1

Šećerna bolest tipa 1 heterogena je bolest koju karakterizira razaranje beta stanica gušterače koje završava potpunim nedostatkom inzulina. Većina slučajeva, preko 90 %, uzrokovana je autoimuno posredovanom reakcijom T-limfocita s posljedičnim razaranjem beta stanica (tip 1a), dok manjina slučajeva nastaje zbog idiopatskog uništenja ili nestanka beta stanica (tip 1b), a bolest se očituje tipičnim simptomima kada se uništi oko 90 % β-stanica gušterače (9). Od ukupnog broja oboljelih od šećerne bolesti na šećernu bolest tipa 1 otpada 5 – 10 %. Serološki markeri autoimunog procesa: protutijela na stanice otočića gušterače (eng. islet cells antibodies), protutijela na membranski protein glutamičku kiselu dekarboksilazu (GAD, od engl. *glutamic acid decarboxylase*), protutijela na protein tirozin fosfatazu IA-2 (engl. *tyrosine phosphatase-like insulinoma antigen 2*) i autoprotutijela na

beta stanični specifični cink transporter 8 (ZnT8, od engl. *zinc transporter 8 autoantibodies*) prisutna su u 85 – 90 % oboljelih (10)**.** Ekspresija ovih protutijela dobno je ovisna, s češćom pojavnošću ICA-e i ZnT8 u djece ispod 10 godina, dok se GAD i IA-2 češće javljaju u starijih dobnih skupina i GAD češće u ženskog spola (11).

1.3.1. Epidemiologija šećerne bolesti tipa 1

Epidemiologija šećerne bolesti tipa 1 (nadalje ŠBT1) iskazana prevalencijom i incidencijom široko varira među državama, no općenito je najčešća metabolička bolest djetinjstva. Češća je u razvijenim zemljama, no prevalencija raste brže u niže i srednje razvijenim zemljama (12). U odraslih ŠBT1 čini otprilike 5% svih dijagnosticiranih bolesnika sa šećernom bolesti. Zadnji podatci govore o gotovo dvostrukom porastu broja oboljele djece u zadnje dvije dekade (13). Godišnja učestalost novih slučajeva kod djece do 10 godina procjenjuje se na 19,7/100 000, a u onih starijih od 10 godina na 18,6/100 000. Porast incidencije u zemljama u razvoju prati trend urbanizacije i promjenu načina života, a među najvažnije čimbenike svakako spada i zapadnjački stil prehrane, koji uz ostale čimbenike okoliša pridonosi ovome porastu, mada mehanizmi nastanka još nisu razjašnjeni (12). Do sada prevladava paradigma o etiologiji ŠBT1 koja pretpostavlja da je izvana potaknuto autoimunosno razaranje beta stanica gušterače u genetski predisponiranih osoba osnovni model (14), mada postoje i alternativne hipoteze (15, 16). Globalna varijacija u incidenciji, prevalenciji i vremenskim trendovima pojavnosti ŠBT1 analizira se iz istraživanja kao što su ono Svjetske zdravstvene organizacije (Multinacionalno istraživanje za dječji dijabetes) poznato kao DIAMOND projekt (17, 18) ili europsko istraživanje poznato kao EURODIAB (19, 20), odnosno SEARCH istraživanje u SAD-u (21). Prema DIAMOND istraživanju, početni izvještaj iz 2000-te godine opisuje pojavnost ŠBT1 u djece ≤ 14 godina života u 50 zemalja širom svijeta u ukupnom iznosu od 19 164 slučajeva u populaciji od 75,1 milijuna djece u razdoblju od 1990. do 1994. godine (17). Naknadno je uočena velika razlika u incidenciji ŠBT1, od čak 350 puta meĐu 100 zemalja u svijetu u rasponu od najniže, 0,1/100 000 stanovnika godišnje u Kini i Venezueli do 57,6/100 000 stanovnika u Finskoj. Nakon Finske, najveću incidenciju imaju Sardinija (40/100 000), Kanada (35,1/100 000), Švedska (34/100 000) i Velika Britanija (33/100 000), a incidencija dalje opada prema južnim i istočnim krajevima. Indoeuropska rasa, naročito stanovnici sjevernih područja, ima najvišu, dok narodi Azije imaju najmanju incidenciju ŠBT1. Japanci imaju incidenciju 2,4/100 000, dok oni koji žive u SAD-u i osobe francuskoga podrijetla u Kanadi imaju dvostruko veću incidenciju ŠBT1 nego u Francuskoj i Japanu, što ukazuje na važnost okolišnih čimbenika rizika na razvoj ŠBT1. Najveća je incidencija u

zimskome razdoblju, što se povezuje s povećanjem izloženosti virusima tijekom toga godišnjeg doba (18). Podjednaki je broj osoba oboljelih od ŠBT1 muškog i ženskog spola, iako je nešto više oboljelih muškaraca, ali ne sa statističkom značajnošću (19). ŠBT1 može se javiti u bilo kojem životnome razdoblju, no s obzirom na dob, dva su vrha incidencije ŠBT1: prvi u dobi od 5 do 7 godina, a drugi u doba puberteta. Prvi se vrh javlja kod polaska u školu, što je vezano s povećanom izloženosti djeteta infektivnim čimbenicima, dok se drugi javlja u pubertetu, a povezan je s pojačanim lučenjem hormona rasta, kao i spolnih hormona (koji su antagonisti inzulina), te s emocionalnim stresom svojstvenim za tu dob (22). Posljednjih se desetaka godina učestalost ŠBT1 povećava za 2 − 5 % godišnje. Zemlje s manjom incidencijom imaju veći porast **(23).** Ukupno povećanje incidencije ŠBT1 zabilježeno je po godišnjoj stopi od 3,2 % u Europi, 4,0 % u Aziji do 5,3 % u Sjevernoj Americi. Sličan trend porasta incidencije zabilježen je i u Hrvatskoj: od 8,9/100 000 izmjerenih za 2003. godinu (24) do 17,8/100 000 za 2012. godinu (25). Incidencija ŠBT1 povećava se s dobi, no najveći je porast zabilježen u ranoj dobi do 5. godine i između 10. i 14. godine, s manjim varijacijama unutar pojedinih zemalja. Pretpostavlja se da su varijacije unutar etničkih skupina posljedica razlika u genetskoj sklonosti, ali sve više i izloženosti okolišnim čimbenicima, čemu u prilog govore izvještaji o značajnijem porastu incidencije ŠBT1 u zemljama koje prolaze kroz brzu društvenu tranziciju. Potvrda toga navodi su nekih autora koji upućuju na povećanje broja novooboljelih od ŠBT1 u djece mlađe od 5 godina od preko tri puta u razdoblju od 1965. do 1996. godine, u odnosu na porast od jedan i pol put u dobi između 10 i 14 godina (26). Povećanje incidencije takvim trendom ne može imati genetsku podlogu, ali upućuje na to da su moguć uzrok okolišni čimbenici (27)**.** Moguće je objašnjenje „higijenska hipoteza– prema kojoj neizloženost virusima u dječjoj dobi može dovesti do povećane sklonosti virusnim infekcijama tijekom trudnoće te u konačnici većemu riziku za razvoj ŠBT1 u potomaka (28). „Hipoteza akceleracije– upućuje na pretpostavku da je porast novooboljelih od ŠBT1 uzrokovan boljim načinom ishrane koji dovodi do povećanoga rasta i razvoja djece. Porast tjelesne mase djece zahtijeva pojačanje metaboličke aktivnosti β-stanica gušterače, što amplificira njihovu imunogenost i posljedično dovodi do većega broja oboljelih od ŠBT1 (29). Zbog svega navedenog aktivno je istraživanje čimbenika rizika za razvoj ŠBT1 izuzetno važno kako bi se prepoznali genetski i okolišni utjecaji i omogućilo pravodobno djelovanje u cilju sprječavanja pojave i liječenja same bolesti.

1.3.2. Čimbenici rizika za razvitak šećerne bolesti tipa 1

Različiti su čimbenici rizika koji utječu na razvoj ŠBT1: dob, spol, rasna pripadnost, genotip, zemljopisni položaj uz sezonsku varijabilnost u pojavnosti bolesti (13).

1.3.2.1. Dob

ŠBT1 glavni je tip dijabetesa u mladih do 20 godina, s udjelom od ≥ 85 % (30, 31). Općenito, incidencija raste od rođenja, s vrhom u dobi od 10 do 14 godina, odnosno javlja se prije puberteta i tijekom njega (18, 19). U zadnje je vrijeme sve veća učestalost ŠBT1 u cijelom svijetu uočena napose u najmlađih u dobi od 1. do 4. godine (1). Stopa incidencije opada nakon puberteta, a čini se da se stabilizira u mladoj odrasloj dobi (15 − 29 godina). Incidencija ŠBT1 u odraslih niža je nego u djece, iako otprilike četvrtina oboljelih od ŠBT1 pripada odrasloj populaciji (32). Za čak do 10 % odraslih za koje se u početku mislilo da imaju ŠBT2 naknadnom se analizom po prispjeću nalaza pozitivnih protutijela utvrdilo da zapravo boluju od ŠBT1. Prema tome, izgleda da se proces razaranja beta stanica u odraslih odvija puno sporije nego u mlađih bolesnika, te je stoga često u početku odgođena potreba za inzulinskom terapijom (33, 34).

1.3.2.2. Spol

Iako je zajednička karakteristika većine autoimunih bolesti nesrazmjerno učestalije pojavljivanje u ženskog spola, u prosjeku je udio djevojčica i dječaka približno podjednak (35). Poseban je obrazac uočen u regijama s visokom incidencijom ŠBT1 (populacija europskog podrijetla) u kojima se registrira nešto veći broj muških bolesnika u odnosu na regije s niskom incidencijom, gdje je veći broj oboljelih osoba ženskog spola (populacija neeuropskog podrijetla) (36, 37). Za populaciju europskog podrijetla mnogi izvještaji ukazuju na nešto veći broj ŠBT1 u odraslih muških osoba (29, 38 − 40).

1.3.2.3. Rasna i etnička pripadnost

SEARCH istraživanje pokazalo je razlike u incidenciji ŠBT1 u raznih etničkih skupina na teritoriju SAD-a. U bijelaca je prevalencija ŠBT1 iznosila 2/1000, a incidencija je bila 23,6/100 000, s nešto višom stopom incidencije za muškarce nego za žene, što je među najvišima u svijetu. Među afroamerikancima prevalencija je ŠBT1 0,57/1000 (95 % CI 0.47 − 0.69) za djecu od 0 do 9 godina, odnosno 2,04/1000 (1,85 − 2,26) za dobnu skupinu od 10 do 19 godina. Incidencija ŠBT1 za djecu od 0 do 9 godina starosti i dobnu skupinu od 10 do

19 godina starosti u razdoblju 2002. – 2005. iznosila je 15,7/100 000. Incidencija ŠBT1 u mladih u latinskim zemljama iznosila je 15/100 000 i 16,2/100 000 za djevojčice i dječake od 0 do 14 godina starosti, a među azijskim i pacifičkim populacijama 6,4 i 7,4/100 000 (41).

1.3.2.4. Genetski čimbenici

Više je gena umiješano u razvoj predispozicije za ŠBT1 ili djeluju protektivno na razvoj ŠBT1, a najvažniji su ljudski leukocitni antigeni HLA kompleksa, posebice HLA razreda II. HLA sustav leukocitnih antigena (skr. od *human leukocyte antigen*) obuhvaća kompleks proteina na površini stanice koji su odgovorni za reguliranje imunološkog sustava kod čovjeka. Grupa gena odgovornih za sintezu antigenih supstanci ovog sustava nalazi se na kromosomu 6 i kodira stanične proteine koji imaju i mnoge druge funkcije. HLA geni ljudska su verzija glavnih kompleksa histokompatibilnosti (MHC-a, gena i njihovih produkata koji se nalaze u većini kralježnjaka) zbog čega su i najviše proučavani među svim MHC genima. Proteini kodirani od strane određenih gena također su poznati kao HLA antigeni (rezultat povijesnog porijekla njihova naziva; Human Leucocyte Antigens), a izučavani su zbog njihova značaja u transplantaciji organa. Glavne HLA supstance bitni su element za funkciju imuniteta. Različite klase imaju različite funkcije: HLA antigeni odgovaraju MHC klasi I *(42).* Proteini koji su kodirani s HLA lokusa nalaze se na površini stanice i jedinstveni su za svaku osobu. U imunološkom smislu HLA prepoznaje vlastite i strane stanice. Svaka vlastita stanica izražava HLA tip osobe kojoj pripada i prema tome nije napadač na stanice istog organizma. Kada strani patogen ulazi u tijelo, specifične ga antigen-prezentirajuće stanice (APC) progutaju u procesu koji se zove fagocitoza. Proteini iz patogena probavljaju se u male komadiće (peptide) i stavljaju na HLA antigene specifične MHC klase (klasa II). Otkriveni od strane antigen-prezentirajućih stanica potiču u T-stanicama razne efekte usmjerene na uklanjanje patogena. HLA tipovi su nasljedivi, a neki su od njih povezani i s autoimunim poremećajima i drugim bolestima. Osobe s određenim HLA antigenom češće razviju određene autoimune bolesti kao što su šećerna bolest tipa 1, ankilozirajući spondilitis, celijakija, sistemski eritemski lupus, miastenija gravis, miozitis, Sjögrenov sindrom i narkolepsija. Postoje 3 glavne i 2 male grupe proteina MHC klase II koji su kodirani iz HLA sustava. Geni klase II kodiraju kombinirani oblik heterodimernih (αβ) proteinskih receptora koji se tipski javljaju na površini antigen-prezentirajućih stanica. Glavna su grupa MHC klase II: HLA-DP, HLA-DQ i HLA-DR (43). Dva haplotipa HLA kompleksa razreda II (HLA-DR3 i DR4) posebno su predisponirajuća za razvoj ŠBT1 (44). Iako su 90 – 95 % djece s ŠBT1 nositelji jednog ili oba predisponirajuća haplotipa, oko 5 % ili manje osoba s navedenim HLA

haplotipovima zapravo razvije klinički manifestnu bolest (45). Otprilike 40 − 50% obiteljske povezanosti u ŠBT1 pripisuje se alelnim promjena u HLA regiji (46), dok je u preostalih genetski rizik vezan za više različitih gena, od kojih svaki ima manji utjecaj na individualnu genetsku osjetljivost (44). S porastom incidencije ŠBT1 u zadnjim se dekadama, međutim, ne uočava trend povećane povezanosti s HLA genima rizika, što zapravo upućuje na veći utjecaj okolišnih čimbenika u razvoju bolesti (47, 48). Rizik za razvoj ŠBT1 20 je puta veći u onih s pozitivnom obiteljskom anamnezom u pravcu ŠBT1 u odnosu na ostatak populacije, gdje taj rizik iznosi 1 : 300 (49), a u jednojajačanih blizanaca rizik je > 60 % (50). U dizigotnih blizanaca rizik je 6 – 10 %. Braća i sestre djece oboljele od ŠBT1 prije dobi od 5 godina imaju 3 − 5 puta veći kumulativni rizik za razvoj dijabetesa do 20-e godine u odnosu na braću i sestre djece oboljele između dobi od 5 i 15 godina (51). Rizik za ŠBT1 u djece oca dijabetičara iznosi 3,6 – 8,5 %, a u djece majke dijabetičarke 1,3 – 3,6 % (52). Od prije je dobro poznata povezanost između ŠBT1 i drugih autoimunih bolesti, kao što su autoimuna bolest štitnjače, Addisonova bolest, celijakija i autoimuni gastritis (53). Svrstavanjem unutar skupina ovih autoimunih bolesti uočena je povezanost s genima unutar glavnog histokompatibilnog kompleksa (54).

1.3.2.5. Sezonska pojavnost

Sezonski uzorak u pojavnosti ŠBT1 s povećanim brojem slučajeva tijekom kasne jeseni, zime i ranog proljeća dobro je poznat i više puta potvrđen u brojnim istraživanjima (55). Navedena je tvrdnja, pretpostavlja se, posljedica prije svega veće učestalosti infekcija u navedenim godišnjim razdobljima, za koje se smatra da su povezana i s patogenezom nastanka ŠBT1. Enterovirusi mogu izravno uništiti β-stanice gušterače, a isto tako mogu pokrenuti autoimunu reakciju ili lokalnu upalnu citokinsku reakciju s povećanjem koncentracije slobodnih radikala koji uništavaju β-stanice (56). Hipoteza molekularne mimikrije upućuje na postojanje okolišnih antigena koji su slični antigenima β-stanica gušterače te se u njihovoj prisutnosti javlja reakcija imunološkoga sustava na vlastite antigene. Iako je virusna infekcija pretpostavljena kao mogući okidač destrukcije β-stanica, suprotno tome nedovoljna izloženost ranim infekcijama može povećati rizik za razvoj ŠBT1, s obzirom na to da je sazrijevanje imunološke regulacije u dojenačkom razdoblju potaknuto izlaganjem mikrobima (57). Teza o izravnoj povezanosti određenih infekcija s pojavom ŠBT1 ostaje do danas i dalje nepotvrđena (58). Druga hipoteza objašnjava sezonsku varijabilnost pojave ŠBT1 s razlikama u razini D- vitamina u trudnica pred porod, što bi pretpostavljeno trebalo imati utjecaja na procese sazrijevanja imunološkog sustava i aktivacije destrukcije β-stanica (59, 60).

Navedenu tvrdnju potvrđuju i proučavanja primjene ulja jetre bakalara (bogat izvor vitamina D) tijekom trudnoće (61) i prve godine života (62), što je povezano s nižom razinom pojavnosti ŠBT1. Nedavna izvješća pokazuju da je nedostatak vitamina D uobičajen u pedijatrijskoj populaciji u SAD-u (63), čak i u suncem bogatom okolišu (64).

1.3.2.6. Okolišni čimbenici

Populacijske, obiteljske i blizanačke studije navode na zaključak prema kojemu je većina oboljelih od ŠBT1 genetski sklona nastanku bolesti. Kako se genetski čimbenici koji donose rizik za ovu, ali i za druge autoimune bolesti, ne mogu bitno promijeniti u kratkom roku, za pretpostaviti je da čimbenici iz okoline utječu na povećanje pojavnosti autoimunog dijabetesa. O kojim je okolišnim čimbenicima točno riječ, još nije utvrđeno, no povećanje pojavnosti šećerne bolesti tipa 1 pokušavalo se povezati s načinom prehrane, toksinima iz hrane, programom cijepljenja i zagađenjem okoliša. U zadnje se vrijeme često navodi kako „prezaštićujemo" djecu time što imamo bolji program cijepljenja, snažniju higijensku zaštitu, a sve to ne dopušta sazrijevanje imunološkog sustava. Postoje razmišljanja da bi uzrok promjene mogao biti i poremećen imunosni sustav probavnog trakta u ranoj životnoj dobi, s obzirom na današnji način prehrane, a što se trenutačno pokušava dokazati u više istraživanja. Da negenetski, dakle, okolišni čimbenici igraju ulogu u razvoju ŠBT1, svjedoče migracijska istraživanja u kojima se prikazuje sve veći broj slučajeva oboljelih u genetski stabilnih populacija. S obzirom na to da je put aktivacije imunološkog sustava koji potiče uništavanje β-stanica gušterače i dalje u velikoj mjeri nepoznat, pokrenut je velik broj istraživanja koja se bave i tim problemom**.** Hipoteza molekularne mimikrije upućuje na postojanje okolišnih antigena koji su slični antigenima β-stanica gušterače te se u njihovoj prisutnosti javlja reakcija imunološkoga sustava na vlastite antigene (56). Nutritivni čimbenici koji su bili ispitivani su kravlje mlijeko, dojenje, gluten te vitamini D i E (45). Dokazi o povezanosti ranog uvođenja kravljeg mlijeka u dojenčadi (ili zaštitni učinak konzumacije majčinog mlijeka) s razvojem ŠBT1 dvosmisleni su (65-68) i mogu ovisiti o genetskoj sklonosti (69). Vrijeme uvođenja žitarica (glutena) i drugih namirnica u dojenačku prehranu pokazalo je da može mijenjati rizik za razvoj autoimunih bolesti i ŠBT1 (65, 70, 71). Povećana uporaba vitamina D tijekom djetinjstva povezana je sa smanjenim rizikom razvoja ŠBT1 (72). Povećana majčinska konzumacija vitamina D tijekom trudnoće također je bila povezana sa smanjenim rizikom razvoja ŠBT1 u djece (73). Zaštitna uloga u odnosu na razvoj ŠBT1 zabilježena je za serumski alfa tokoferol (74). Unatoč ovim intrigantnim nalazima, malo je izravnih čvrstih dokaza o važnosti prehrambenih čimbenika u etiologiji ŠBT1, budući da

je teško odrediti čimbenike iz okoliša koji imaju najsnažniji učinak na razvoj bolesti. Postoje, naime, teškoće u prepoznavanju i izračunu duljine trajanja i jačine njihova učinka u prvim godinama života. Čimbenici iz okoliša, također, djeluju neistodobno i mnogostruko. Moguće je da okolišni čimbenici djeluju kao endogeni disruptori ili imaju utjecaj na slabljenje djelotvornosti gena koji imaju zaštitnu ulogu u razvoju dijabetesa, a prema zadnjim pretpostavkama znanstvenika nije isključen niti utjecaj elektromagnetskog zračenja.

1.4. KLINIČKI TIJEK, LIJEČENJE I KOMPLIKACIJE ŠEĆERNE BOLESTI TIPA 1

1.4.1. Patozifiološki mehanizmi u razvoju šećerne bolesti tipa 1

Inzulin je, kao vodeći anabolički hormon, nužan za iskorištavanje hranjivih tvari iz hrane. Nakon unosa hrane u organizam inzulin potiče pohranu masti, glikogena i bjelančevina. Ukoliko inzulina nema, ne dolazi do ulaska glukoze u stanice, što dovodi do glikogenolize, lipolize, proteinolize i glukoneogeneze u jetri. Hiperglikemija je stanje određeno sljedećim čimbenicima: smanjenim ulaskom glukoze u stanice, glukoneogenezom u jetri i glikogenolizom. Nedostatak inzulina dovest će i do poremećene ugradnje aminokiselina u tkivo, negativnoga proteinskog balansa uz gubitkak mišićnih bjelančevina i povećane glukoneogeneze. U ranoj fazi razvoja ŠBT1 prevladava hiperglikemija, a acidoza, ketonemija i ketonurija javljaju se naknadno. Nedostatak inzulina dovodi do smanjenoga ulaska masnih kiselina u masne stanice, dok se lipolizom povećava koncentracija glicerola, triglicerida i slobodnih masnih kiselina koji se potom metaboliziraju u ketone. Nedostatak inzulina dovodi do razvoja dijabetičke ketoacidoze, ali i pojačanoga lučenja kontraregulatornih hormona kao što su glukagon, katekolamin, kortizol i hormon rasta. Hiperglikemija dovodi do osmotske diureze i izlučivanja glukoze u urin, zbog čega dolazi do nastanka poliurije. Također, dolazi do pasivnoga gubitka elektrolita. Napredovanjem bolesti dolazi do dehidracije, dok lipoliza dovodi do porasta ketona, što uzrokuje stanje metaboličke acidoze (56).

1.4.2. Klinički tijek i stadiji bolesti

Šećerna bolest tipa 1 karakterizirana je pretkliničkim dijabetesom, klinički razvijenim dijabetesom, djelomičnom remisijom stanja i na kraju ponovnim intenziviranjem bolesti i doživotnom ovisnošću o inzulinu. Razvoj ŠBT1 počinje genetskom predisponiranošću, a završava potpunim uništenjem β-stanica gušterače. Pretklinički se dijabetes počinje razvijati mjesecima ili godinama prije konačne manifestacije bolesti, a protutijela na otočiće gušterače, tirozin fosfatazu, dekarboksilazu glutaminske kiseline, kao i inzulinska protutijela mogu se pronaći kao biljeg autoimunosti na β-stanice gušterače (75). Osim imunološkoga i genetskoga biljega,

rizik za razvoj ŠBT1 može se odrediti mjerenjem inzulinskoga odgovora prilikom intravenskga opterećenja glukozom. Inzulinski odgovor prilikom intravenskoga opterećenja glukozom manji od desete percentile za dob i spol upućuje na rizik od 60 % za razvoj ŠBT1 u sljedećih 5 godina (76)**.** Dva i više protutijela na otočiće stanica gušterače predstavljaju rizik od 25 do 50 % za razvoj ŠBT1 u idućih 5 godina i bez oštećenja inzulinskoga odgovora prilikom intravenskog opterećenja glukozom (77)**.** Klinički tijek ŠBT1 obično karakterizira akutna pojava klasičnih simptoma šećerne bolesti: poliurije, polidipsije i gubitka težine. MeĐutim, s obzirom na povećanu svijest o ŠBT1, postoje istraživanja u kojima su raĐeni probiri rizične djece analizom serumskih vlastitih protutijela, što je omogućilo otkrivanje ŠBT1 u ranim fazama bolesti. Identifikacija pacijenta s rizikom za razvoj ŠBT1 i intervencija kako bi se usporilo ili zaustavilo autoimuno razaranje β-stanica u središtu su istraživanja. Ovo početno razdoblje s ostatnom funkcijom β-stanica naziva se i medeni mjesec, nakon kojeg, kao rezultat napredovanja autoimunog razaranja, neminovno slijedi smanjenje funkcije β-stanica, što potvrđuju i nemjerljive razine C-peptida u serumu, čime kontrola bolesti postaje sve složeniji izazov za djecu, roditelje i zdravstvene djelatnike. Klinički početak često počinje dijabetičkom ketoacidozom o čemu izvještava EURODIAB grupa koja opisuje frekvenciju, jačinu i zemljopisne varijacije u preko 24 centra u Europi gdje je poliurija najčešći prvi simptom (96 %), nakon čega slijede mršavljenje (61 %) i umor (52 %) (20). Trajanje simptoma kraće je od 2 tjedna u 25 % djece češće mlaĐe od 5 godina, što zahtijeva obrazovanje populacije za prepoznavanje simptoma ŠBT1, čime se može unaprijediti rano otkrivanje i smanjiti težinu metaboličkog poremećaja pri postavljanju dijagnoze. Dijabetička ketoacidoza kao početni simptom (definira se kao pH < 7,3) opisana je u 42 % djece, 33 % ima umjerenu (pH izmeĐu 7,3 i 7,1), a 9 % se javlja s teškom ketoacidozom (pH < 7,1). U zadnje se vrijeme, kao rezultat informiranja stanovništva, uočava značajni pad udjela novodijagnosticiranih mladih koji se prezentiraju s dijabetičkom ketoacidozom**.**

1.4.3. Terapijski pristup

Smjernice su u liječenju ŠBT1 poznate (78), a uključuju niz terapijskih opcija od višestrukih dnevnih injekcija inzulina brzog djelovanja tijekom obroka u kombinaciji s dnevnim bazalnim inzulinom, do kontinuirane supkutane infuzije inzulina putem inzulinske pumpe. Nedostatak je inzulina kompliciranо liječiti jer se moraju simulirati velike varijacije njegova fiziološkoga lučenja u organizmu iz trenutka u trenutak. Dosadašnjim metodama liječenja, uz vrlo rijetke iznimke, u oboljelih je teško postići normoglikemiju i normalne vrijednosti HbA1c-a. Dobrom kontrolom glikemije (HbA1c < 7,5 %) sprječavaju se kratkoročne i dugoročne komplika-

cije bolesti, pri čemu je važna i primjena preporuka za praćenje mikrovaskularnih (retinopatija, neuropatija i nefropatija) i makrovaskularnih (kardiovaskularnih) komplikacija bolesti (Melendez-Ramirez, Richards i Cefalu). Neovisno od načina primjene inzulina, cilj je terapije postizanje dobre kontrole glikemije koja je kamen temeljac u liječenju šećerne bolesti. Međutim, rezultati DCCT istraživanja pokazuju da je prosječna vrijednost HgA1c-a u mladih veća u odnosu na odrasle za 1 - 2 % i u intenziviranom i u konvencionalnom modelu liječenja. Unatoč tome, učestalost hipoglikemije bila je viša u adolescenata nego u odraslih (79). Novija istraživanja objavljena nakon DCCT istraživanja pokazala su prosječne vrijednosti HbA1c-a koje su ostale više od planiranih ciljeva. Tako Hvidore istraživanje pokazuje prosječan HbA1c od 8,6 % u populacije mladih diljem svijeta (80), a podatci iz drugih istraživanja prosječne vrijednosti HbA1c-a od 8,2 %, od čega 17 % ima HbA1c ≥ 9.5 % (81). Podatci iz DCCT istraživanja, kao i nekih kasnije rađenih, nedvojbeno pokazuju da dobra kontrola glikemije poboljšava vaskularne ishode u ŠBT1 (13). Razvoj ranih kroničnih komplikacija statistički začajnije korelira s lošom regulacijom glikemije, pojavom bolesti u ranoj dobi i dužim trajanjem bolesti, težinom > 85 percentila (vs pretilo), u djece samohranih roditelja, ovisno o rasnoj ili etničkoj pripadnosti i, dakako, kvaliteti edukacije roditelja (81). Napredak tehnologije doveo je do razvoja novih mogućnosti u liječenju, kao što je sredinom 1990-ih godina, nakon otkrića brzodjelujućih inzulina, primjena inzulinskih pumpi (kontinuirano potkožna inzulinska infuzija − CSII). Ova terapija postala je široko prihvaćena u mladih te pokazuje dobre rezultate (82, 83). Postoji velika nada da će daljnji tehnološki napredak dovesti do poboljšanja kontrole glikemije, a svakako je tu značajan razvoj sustava kontinuiranog praćenja glukoze u krvi (CGM) čijom je primjenom u djece zabilježeno održavanje prosječne vrijednosti HbA1c-a ispod 7 % uz značajno manju učestalost hipoglikemijskih epizoda (84).

1.4.4. Učestalost komplikacija

DCCT istraživanje pokazalo je da dobra kontrola glikemije u ŠBT1 smanjuje dugoročne vaskularne komplikacije hiperglikemije. Unatoč tome, dijabetičke komplikacije i dalje će biti jedan od glavnih uzroka pobola i smrtnosti u osoba sa ŠBT1, a među njima prije svega kardiovaskularne bolesti (85). Međutim, intenzivirana inzulinska terapija s poboljšanom kontrolom glikemije u DCCT istraživanju pokazala je povećanu učestalost težih hipoglikemija u odnosu na konvencionalnu terapiju (79, 86). U posljednjih nekoliko desetljeća ipak je postignut napredak u skrbi za osobe sa ŠBT1, a on uključuje kućni monitoring glukoze (87) i razvoj analoga humanog inzulina (88), kao i primjenu inzulinskih pumpi, što djeluje preventivno na pojavu kroničnih komplikacija dijabetesa (86). Poboljšana

kontrola bolesnika sa ŠBT1 u zadnje je vrijeme utjecala na smanjenje pojavnosti mikrovaskularnih, manje i makrovaskularnih komplikacija, na temelju čega su izrađene smjernice koje naglašavaju važnost poboljšane kontrole glikemije za poboljšanje zdravlja kardiovaskularnog sustava u mladih sa ŠBT1 (89). Osim kontrole glikemije, hipertenzija i dislipidemije također su važni vaskularni čimbenici rizika, na što svakako treba obratiti pozornost i u djece sa ŠBT1 (90). EURODIAB registar rađen u 12 europskih zemalja pokazuje povećan prosječan mortalitet među djecom oboljelom od ŠBT1 u odnosu na zdravu djecu od 2,0 (91).

1.5. PATOGENETSKI MEHANIZAM RAZVOJA ŠEĆERNE BOLESTI TIPA 1

1.5.1. Higijenska hipoteza

Kako je u razvijenim zemljama od 1950-ih godina zabilježen kontinuirani porast stope pojavnosti multiple skleroze, Crohnove bolesti, alergijske astme i ŠBT1 za više od 300%, tako je istodobno registriran nagli pad pojavnosti zaušnjaka, ospica, tuberkuloze i drugih zaraznih bolesti, ponajviše zahvaljujući primjeni cjepiva, antibiotika i poboljšanih higijenskih mjera (92). Ova inverzna povezanost smanjene incidencije infektivnih bolesti i porasta stope autoimunih bolesti upućivala je znanstvenike početkom 1990-ih godina na moguću uzročnu povezanost navedenog trenda s disfunkcijom imunosnog sustava (93). Prevalencija alergije na hranu u predškolske djece u zapadnim zemljama povećala se na 10 %, za razliku od 2 % u Kini (94). Broj novih oboljelih od ŠBT1 u Finskoj godišnje iznosi 62,3/100 000 djece, u usporedbi sa 6,2/100 000 u Meksiku i 0,5/100 000 u Pakistanu (95). Incidencija ulcerozna kolitisa dvostruko je veća u zapadnoj Europi nego u istočnoj (6.5/100 000 u odnosu na 3.1/100 000) (96). U svakom od ovih poremećaja imunološki sustav pretjerano reagira na vanjski okidač (poput peludi, kikirikija i drugih sastojaka u hrani ili zagađenje iz okoliša) uzrokujući razvoj organ specifičnih autoimunih bolesti. Kad je riječ o ŠBT1, to je reakcija na β-stanice gušterače. Pored toga, zajednička je odlika svih navedenih poremećaja sve veća učestalost isključivo u razvijenim i tranzicijskim zemljama, što upućuje na utjecaj vanjskih čimbenika kao mogućih uzroka razvoja autoimunih bolesti. Godine 1989. epidemiolog David Strachan u anketi provedenoj na više od 17 000 djece rođene u Britaniji, primijetio je da su djeca rođena u kućanstvu s mnogo subraće i sestara bila manje osjetljiva na ekcem i alergije u prvoj godini kao i kasnije u životu (97). Pod pretpostavkom da više djece u kući znači i više klica koje se dijele, Strachan je zaključio da infekcije u ranom djetinjstvu na neki način štite od alergijskih bolesti. Pri opisu navedenih opažanja upotrijebio je riječ "higijena" što je bilo dovoljno da se po prvi put

1989. godine predloži "higijenska hipoteza" kao moguće objašnjenje trenda porasta autoimunuh bolesti u dječjoj populaciji. Tako je roĐena higijenska hipoteza koja je svoje uporište našla i na molekularnoj razini. Infekcije bakterijama i protozoima aktiviraju T-pomagačke stanice 1 (Th1) imunološkog sustava, koje otpuštaju signalne molekule zvane citokini. Smanjeni kontakt s infektivnim agensima smanjuje Th1 staničnu aktivnost u organizmu, što potom rezultira kompenzatornim povećanjem aktivnosti T-pomagačkih stanica 2 (Th2), a što je primarno karakteristično za alergijske bolesti (98). Tako nedostatak infekcija tijekom djetinjstva smanjuje Th1 aktivnost, uzrokujući povećanje Th2 aktivnosti u tijelu i povećava rizik od alergijskih bolesti. Naknadna istraživanja, međutim, pokazala su svu manjkavost navedene hipoteze. Prvi su bili rezultati Marije Yazdanbakhsh, koja je istraživanjem parazitarnih infekcija u nerazvijenim zemljama u kojih su alergijska stanja rijetka također zabilježila predominacija Th2 staničnog odgovora, što se nije uklapalo u prethodno postavljene pretpostavke molekularnog mehanizma higijenske hipoteze (99). Drugi očiti nedostatak ove hipoteze proizlazi iz istraživanja autoimunih poremećaja koja su jasno naknadno pokazala povećanu Th1 staničnu aktivnost i u autoimunih bolesti. Naknadno su epidemiološka istraživanja pokazala da nema smanjena rizika razvoja alergijskih bolesti u slučajevima oboljelih od ospica i u djece sa čestim respiratornim infektima (100).

1.5.2. Interakcija imunosnog sustava i crijevne flore

Godine 2003. Graham Rook i suradnici predložili su novo objašnjenje za porast incidencije autoimunih bolesti koje je Rook nazvao hipotezom "starih prijatelja" (101). Naime, riječ je o koegzistenciji ljudskog organizma s nizom nepatogenih mikrorganizama kojih smo bili lišeni, a na koje smo navikli i o kojima smo bili ovisni više nego se mislilo. Hipoteza ukazuje na važnost rane i redovite izloženosti ovim bezazlenim mikroorganizmima "starim prijateljima" koja je prisutna tijekom ljudske evolucije i prepoznata od imunog sustava, a koja je bitna u njegovu sazrijevanju. U vremenu koje je slijedilo postalo je potpuno jasno da mikrorgranizmi domaćina igraju aktivnu ulogu u ljudskom zdravlju počevši od poroda pa tijekom cijeloga života. Majčini mikroorganizmi koloniziraju crijeva u djeteta već za vrijeme trudnoće, zatim pri prolasku kroz porođajni kanal, za vrijeme dojenja, a postupak se nastavlja tijekom života unosom mikroba iz okoline u kojoj dijete obitava (102). Pararelno otkriće T-regulatornih limfocita (Treg) u imunologiji omogućilo je Rooku pretpostavku da izlaganje nepatogenim mikrobima aktivira razne imune procese uključujući i Treg-staničnu aktivnost koja je bitna u adekvatnoj regulaciji i sazrijevanju imunosnog sustava. Prema Bloomfeldu imunološki sustav tako uči ne samo na što od vanjskih agenasa odreagirati nego i što tolerirati. Problem nastaje

kada naš imunološki sustav dođe u kontakt s velikim brojem alergena koje ne prepoznaje kao bezopasne. Vjerojatno je da su radikalna poboljšanja u sanitarnim higijenskim uvjetima u kasnom 20. stoljeću uključena u smanjenje naše izloženosti tim mikrobima. MeĐutim, istodobna promjena velikog broja čimbenika koji najvjerojatnije imaju čak i veći utjecaj, osobito u ranim fazama života, kao npr. porod carskim rezom, rana primjena antibiotika, promjene u prehrani, mijenja reakcije i sposobnost modulacije našeg imunosnog sustava. Jedno od najvećih istraživanja koje je ispitalo povezanost crijevne flore i poremećaja imunološke regulacije je multicentrično DIABIMMUNE istraživanje, koje je, počevši od 2008. ispitivalo i pratilo obitelji iz tri susjedne zemlje s bliskom genetskom pozadinom, ali s razlikom u incidencijama astme i ŠBT1. U navedeno istraživanje bile su uključene industrijalizirana Finska, s najvišom svjetskom incidencijom ŠBT1, ubrzano modernizirajuća Estonija, sa sve većom incidencijom ŠBT1 i astme i Rusija, gdje su obje bolesti u usporedbi s prethodnim primjerima još uvijek rijetke. Analizom uzoraka stolice u više od 200 djece praćene od roĐenja do dobi od 3 godine DIABIMMUNE istraživanje pokazalo je da novorođenčad u Finskoj i Estoniji u stolici pretežito sadrži vrstu Bacteroides, dok je u novorođenčadi u Rusiji prevladavala Escherichia coli (E. coli). Vanjske membrane obje vrste bakterija sadrže velike molekule lipopolisaharide (LPS), ali dok LPS vrste E. coli aktiviraju snažan imunosni odgovor u čovjeka, dotle LPS vrste Bacteroides zapravo inhibiraju imunološki sustav. Dakle, u usporedbi s ruskom djecom, može se reći da je imunosni sustav crijeva u finske i estonske djece utišan čineći ih sklonima jakim nereguliranim imunološkim reakcijama i poremećajima poput razvoja ŠBT1 (103). Nedavno provedena istraživanja pokazuju značajnu promjenu sastava crijevne flore meĐu ljudima koji žive u razvijenim zemljama u odnosu na one iz nerazvijenih zemalja. Danas je važeći koncept taj da postoji specifična mikrobiološka ekspozicija koja nas je štitila te da smo njenim gubitkom postali osjetljiviji na razvoj autoimunih bolesti. Primjerice, čini se da zapadnjačka prehrana, bez biljnih vlakana i drugih specifičnih raznolikih sastojaka, remeti razvoj zdrave crijevne flore (104). Od prehrane do antibiotika, svaki novi vanjski čimbenik pridonosi sve većim promjenama crijevne flore i time imunološkog statusa organizma. Odnos izmeĐu vremena izlaganja i pojave bolesti i dalje je nepoznanica, no pretpostavlja se da izostanak izlaganja vanjskim mikrobima u ranom djetinjstvu povećava vjerojatnost autoimunih procesa kasnije u životu. Početkom 2016. godine stručnjaci za zarazne i alergijske bolesti Rook i Bloomfield zahtijevali su promjenu imena higijenske hipoteze, s obzirom na to da riječ higijena prejudicira što je uzrok trenda porasta autoimunih bolesti jer ne uključuje sve vanjske čimbenike koji su bitni u razvoju imunoloških poremećaja (105). Koliko je proces složen, govori i činjenica da smanjenje higijenskog standarda ne bi preokrenulo trend porasta autoimunih bolesti,

već bi samo povećalo rizik razvoja zaraznih bolesti. Radi pojašnjavanja problema, različiti istraživački timovi danas predlažu alternativna imena, kao što su „hipoteza o smanjenju crijevne flore– ili „mikrobiološka hipoteza o raznovrsnosti– te, naravno, naziv „hipoteza starih prijatelja–. Drugi je problem ove hipoteze nedostatak dokaza koji bi pokazali kako smanjiti stope alergijskih i autoimunih bolesti. Iako postoje stotine opservacijskih i epidemioloških istraživanja, malo je randomiziranih, kontroliranih prospektivnih istraživanja koja opisuju specifičan utjecaj vanjskih intervencija na imunološki sustav, s izuzetkom ispitivanja koje je uključivalo eksperimentalno inficiranje helmintima (106) do tretmana s probioticima kod autoimunih bolesti (107). Štoviše, nedavno istraživanje utjecaja poroda carskim rezom pokazalo je da on nema utjecaja na mikrobiološku floru dojenčeta do 6 tjedana starosti (108). Najnovija se istraživanja umjesto na vanjske čimbenike rizika sada usmjeravaju na identifikaciju regulatornih puteva koji osposobljavaju imunološki sustav za normalnu funkciju. Pronalazak ovih puteva omogućio bi primjenu novih lijekova ili probiotika koji bi aktivirali te puteve još u ranom djetinjstvu i omogućili adekvatno sazrijevanje imunog sustava. Cilj ove nove terapije nije potpuno utišati imunosni sustav na nespecifičan način kao što je to slučaj kod steroidne terapije, nego pojedinca tretirati s personaliziranom mikrobnom smjesom koja bi inducirala imunološke regulatorne stanice.

1.5.3. Inzulitis

Prošlo je više od 100 godina otkako su karakteristični upalni infiltrati ograničeni u Langerhansovim otočićima opisani u djeteta koje je umrlo u dijabetičkoj ketoacidozi. (109). Lezija je kasnije dobila naziv inzulitis i od tada se smatra patognomoničnim nalazom u djece s novootkrivenim ŠBT1(110). Infiltrat se sastoji pretežno od T-stanica, u kojima dominiraju CD8 + limfociti, ali također mogu sadržavati CD4 + limfocite, B-limfocite i makrofage (111). Stanični odgovor prati humoralni odgovor koji uključuje proizvodnju protutitijela na široku lepezu β-staničnih antigena (112). Međutim, brojni vlastiti antigeni protiv kojih je upalni odgovor usmjeren nisu identificirani niti je utvrđeno je li humoralni odgovor, koji se smatra dijelom naših sadašnjih dijagnostičkih kriterija, uzrok ili posljedica bolesti. Iako postoje životinjski modeli za proučavanje ove bolesti, kao što su modeli s NOD miševima, ostaje otvoreno pitanje jesu li podatci dobiveni na tim modelima primjenjivi za ljudsku populaciju, s obzirom na razlike među vrstama (113). Analiza tkiva gušterače post mortem ukazuje na raspršene Langerhansove otočiće u matrici egzokrina tkiva koji čine 1 – 2 % samog parenhima žlijezde, pri čemu su upalni infiltrati nađeni u dijelu otočića samo u pojedinim režnjevima i nehomogeno raspoređeni, dok drugi otočići ostaju netaknuti. Lezije se uglavnom

nalaze u otočićima u kojima su β-stanice i dalje prisutne, a nestaju zajedno s β-stanicama prema kojima je reakcija usmjerena. Osim toga, nekoliko slučajeva koje su opisali obducenti predstavlja samo fulminantne oblike bolesti, koji nisu nužno karakteristični i za sve ostale faze bolesti. I na kraju, a možda i najvažnije, patohistološke lezije koje uočavamo u novootkrivenih bolesnika možda prikazuju samo završne faze procesa koji u osnovi traje već duže vrijeme. Prepoznavanje bolesnika u pretkliničkoj fazi bolesti i ispitivanje imunoloških procesa koji se događaju u toj fazi neophodni su za naše daljnje istraživanje usmjereno na otkriće etiologije ŠBT1. Navedeni podatci pokazuju da ljudska β-stanica posjeduje izuzetan potencijal za regeneraciju, napose u pretkliničkoj fazi bolesti, te da ključno pitanje u rješavanju patogeneze ŠBT1 nije razlog nestanka β-stanica, već sposobnosti regeneracije (114).

1.5.3.1. Povijest istraživanja inzulitisa

Upalne infiltrate u Langerhansovim otočićima 1902. godine prvi je puta opisao njemački patolog Schmidt kao malena žarišta stanične infiltracije u periferiji Langerhansovih otočića u gušterači desetogodišnjeg djeteta oboljeloga od ŠBT1 (115). Te specifične upalne infiltrate kasnije je švicarski patolog von Meyenburg nazvao „inzulitisom" (116). Godine 1928. Stansfield i Warren prvi su skrenuli pozornost na povezanost inzulitisa s fulminantnim tijekom dijabetesa, opisavši opsežnu limfocitnu infiltraciju u otočiće gušterača dviju djevojčica koje su preminule nedugo nakon pojave bolesti u dijabetičkoj komi (117). Le Compte je 1958. godine opisao četiri slučaja s inzulitisom i predložio četiri moguća objašnjenje ovih upalnih infiltracija: izravan upalni odgovor na otočiće zbog prisutnosti stranog uzročnika, očitovanje funkcionalne prekomjerne stimulacije upale, reakcija na ozljedu nastalu od nekog nepoznatog nebakterijskog uzroka i, na kraju, reakcija antigen − antitijelo. Patolog je Willy Gepts, suradnjom s više bolnica iz SAD-a, Kanade i Belgije, 1965. godine prvi prikupio dovoljno veliku zbirku uzoraka tkiva, što mu je omogućilo procjenu prave učestalosti i značaja inzulitisa u mladih pacijenata. Naknadnom evaluacijom inzulitis je uočio u 68 % slučajeva novootkrivenih dijabetičara, što nije bio slučaj u dugogodišnjih bolesnika (118). Razvojem imunohistokemijskih metoda i ponovnom analizom uzoraka opisao je brojne histološke promjene u otočićima i β-stanicama, uključujući i prisutnost otočića koji su sadržavali samo α-stanice uz fibrozaciju intersticija, nazvavši ih „pseudo-atrofičnim" otočićima. Upalni su infiltrati nađeni samo u otočićima koji su još sadržavali preostale funkcionalne β-stanice, a kojih je još preostalo i nakon niza godina od početka bolesti u prosjeku oko 13 %. Osim navedenoga, Gepts je, s obzirom na prisutnost limfocitne

infiltracije u otočićima, upozorio na moguću autoimunu etiologiju čemu u prilog govore pokusi na animalnim modelima u kojima je inducirani inzulitis popraćen prisustvom protutijela na inzulin, kao i na učestaliju pojavnost juvenilnog dijabetesa s ostalim autoimunim bolestima tipa autoimuna tireoiditisa. U svojem istraživanju iz 1978. godine pronašao je dodatne argumente za tvrdnju da je riječ o autoimunom procesu jer je primijetio da se upala javlja samo u otočićima s funkcionalnim β-stanicama što ga navodi na zaključak da „inzulitis predstavlja imunološku reakciju usporenog tipa, posebno usmjerenu protiv β-stanica– (119). Foulis i suradnici naknadnom su retrogradnom računalnom analizom podataka u Velikoj Britaniji na 119 uzoraka uglavnom mladih pacijenata dobi do 20 godina s akutnim tijekom bolesti uočili i imunohistokemijski indentificirali u 78 % oboljelih identične promjene na otočićima koje je prethodno opisao Gepts i time pridonijeli potvrdi njegove hipoteze o autoimunoj etiologiji inzulitisa (120).

1.5.3.2. Inzulitis u pretkliničkom stadiju

Ono što promatramo histološki u početnoj kliničkoj prezentaciji dijabetesa, prema mišljenju Geptsa, zapravo je završna faza procesa koji je već duže vrijeme prisutan u gušterači. Ako se prisutnost cirkulirajućih protutijela protiv antigena otočića smatra markerom β-staničnog uništenja, onda proces vjerojatno traje godinama prije kliničke manifestacije bolesti. Utvrđivanje incidencije i vremenskog tijeka inzulitisa prije postavljanja dijagnoze i povezanost s pojavom cirkulirajućih imunoloških markera, bit će presudna za razumijevanje tijeka bolesti i razvoja imunoloških intervencijskih terapija oslanjajući se na podatke o regenerativnim sposobnostima β-stanične mase. Inzulitis je karakterisitčan za mlađe bolesnike s akutnim nastupom bolesti, no treba navesti da bi proces mogao uključivati epizode fulminantnog uništenja nakon kojega slijede epizode popravka i regeneracije. No isto tako, nisu svi pojedinci koji su autoantitijela pozitivni razvili manifestnu bolest. Nedavno patohistološko istraživanje pokazalo je da gušterače većine bolesnika nakon 20 i više godina trajanja bolesti zadrže funkcionalne β-stanice raspršene među ekstrainzularnim tkivom ili u manjim klasterima (121). Istovremena pojava apoptoze i replikacije β-stanica zabilježene su u većine bolesnika uz nalaz niske razine limfocitarne infiltracije otočića s lobularnom raspodjelom zaostalih β-stanica. Nedavno su također Gianani i suradnici, proučavajući nalaze 20 bolesnika s dugim trajanjem bolesti, utvrdili dva osnovna obrasca lokalizacije preostalih β-stanica, bilo da gušterača sadrži mješavinu inzulin-deficijentnih i inzulin-producirajućih β-stanica u većine otočića (obrazac A), ili da postoje funkcionalne β-stanice prisutne samo u nekim regijama gušterače (obrazac B) (122). Dodatna su istraživanja u bolesnika sa ŠBT1

potrebna radi utvrđivanja točnog opsega regeneriranih i preostalih β-stanica (121, 123). Najveća je prepreka za istraživanje etiologije ŠBT1 u čovjeka ograničena dostupnost materijala za proučavanje. Većina slučajeva navedenih u dosadašnjim istraživanjima dostupna je samo u obliku kemijski fiksiranom i u parafin uklopljenim blokovima tkiva te je vrlo malo njih dostupno i pogodno za molekularnu analizu. Biobanke služe za sakupljanje i čuvanje uzoraka tkiva visoke kvalitete i uzoraka krvi iz autoantitijela pozitivnih bolesnika u preddijabetičkoj fazi bolesti, što pruža nove mogućnosti u istraživanju i utvrđivanju etiologije bolesti i identifikaciji antigena na koje je upalni infiltrat usmjeren (124).

1.5.3.3. Uloga proupalnih čimbenika u razvoju inzulitisa

Imunološki sustav podijeljen je na priroĐeni i stečeni. Važnost ovog sustava očituje se u zaštiti organizma od mikrobnih infekcija, ali i tkivnih oštećenja, odnosno malignih promjena stanica i tkiva. Pobuda imunosnog sustava može biti posljedica djelovanja egzogenih (infekcije) ili endogenih čimbenika. U endogene posrednike imunosnog odgovora spadaju alarmini, čija hipersekrecija potiče proupalni odgovor imunološkog sustava i posljedično tomu razaranje β- stanica. Proizvodnja alarmina može biti posljedica endogenog stresa, koji se može povezati i s nedostatkom pojedinih esencijalnih minerala. Poticaj za početak bolesti mogu biti čimbenici iz okoliša, poput virusa (Coxackie grupa B, rubeola, ospice, zaušnjaci, CMV, infektivna mononukleoza), toksičnih kemikalija, izlaganja kravljem mlijeku u novoroĐenačkoj dobi i citokin (125). Gubitak β-stanica uzrokovan je uništenjem limfocitima T prije nego su β- stanice dovoljno sazrele, stoga se najčešće razvija u djetinjstvu i pubertetu, iako se može pojaviti u bilo kojoj dobi (osobito u onih u kasnim 30-im i ranim 40-im godinama). S obzirom na to da je ŠBT1 kulminacija limfocitne infiltracije i uništenja β-stanica Langerhansovih otočića gušterače, smanjenjem te mase smanjuje se i proizvodnja inzulina čime dostupni inzulin više nije dostatan za održavanje normalne razine glukoze u krvi. Nakon što se uništi 80 – 90 % β-stanica, razvija se hiperglikemija i puna klinička slika bolesti. Manifestaciji bolesti prethodi dugotrajni i prikriveni autoimunosni proces ciljanog razaranja β-stanica gušterače. Uništenje β- stanica može biti kontinuirano ili intermitentno, a sam molekulski mehanizam nastanka nije u potpunosti istražen. Pokretanje autoimunosnog procesa u ŠBT1 očituje se histološkom slikom inzulitisa i u konačnici autoimunim razaranjem Langerhansovih otočića. Međutim, treba naglasiti kako se u krvi bolesnika i nekoliko godina prije razvitka bolesti mogu otkriti vlastita protutijela specifična za β-stanice Langerhansovih otočića. Autoprotutijela na stanice Langerhansovih otočića, tzv. ICA (engl. *islet cell antibodies*) cirkulirajuća protutijela na citoplazmu stanica Langerhansovih otočića, IA

protutijela (engl. *insulin autoantibodies*) protiv endogenog inzulina, GADA protutijela na membranski protein β-stanica, te IA-2 protutijela na tirozin fosfatazu nalaze se mjesecima i godinama prije samog očitovanja bolesti (126). Najnovije spoznaje utvrdile su postojanje novog ciljnog antigena humoralne imunosti, a to je cink transporter 8 (ZnT8) koji je transmembranski protein sekrecijskih granula β-stanica (127). Ova autoprotutijela pokazatelj su pobune imunosnog sustava u ŠBT1 i temelj su tvrdnje o dugom razdoblju preddijabetesa koji prethodi klinički razvijenom obliku. U 70 – 80 % bolesnika sa ŠBT1 nalaze se pozitivna protutijela za razliku od 3 – 4 % pozitivnih nalaza u bližih srodnika i 0,5 % u općoj populaciji (128).

1.5.3.4. Pomoćnički T-limfociti u šećernoj bolesti tipa 1

T-pomoćnički tip 17 stanice (Th17) prvi su put 2005. g. identificirane kao različita T-pomoćna stanična linija (129, 130). Otkriće Th17 podskupine ne samo da mijenja klasičnu Th1/Th2 paradigmu u T-staničnih imunoloških odgovora, nego nam također pruža i nove spoznaje o patofiziološkm procesima u nekoliko autoimunih bolesti (131). Za ŠBT1, kao jednu od najčešćih autoimunih bolesti, za koje se prije smatralo da je proces posredovan isključivo Th1 staničnim odgovorom, danas se zna da je posredovana i Th17 staničnom imunošću.

1.5.3.5. Uloga Th17 citokina u šećernoj bolesti tipa 1

Godine 2003. Cua i suradnici pokazali su da je interleukin 23 (IL-23) bio presudan za indukciju eksperimentalnog autoimunog enefalomijelitisa (EAE) i kolagen induciranog artritisa (CIA) (129, 132). Dokazana stimulirajuća uloga IL-23 na T-stanice koje potom proizvode interleukin 17 (IL-17) koji potiče razvoj EAE-a utvrđena je na animalnim modelima. Osim toga, animalni eksperimentalni modeli s izbrisanom p19 podjedinicom IL-23 pokazali su značajno smanjenje broja T-stanica koje proizvode IL-17 te su bili zaštićeni od razvoja EAE-a. Nasuprot tome, modeli s nedostatkom p35 podjedinice IL-12 proizveli su povećanu količinu IL-17 u T-stanicama te su razvili teške oblike EAE-a i CIA-e. Ova istraživanja jasno su pokazala da postoji posebna linija Th1 stanica čija aktivacija ne ovisi o IFN-γ, a što je tipično za Th1 staničnu liniju, već su stimulirane s IL-23 te predstavljaju liniju koja posreduje u razvoju autoimunih bolesti. Tako su 2005. godine znanstvenici formalno predložili naziv Th17 stanica kao zasebni T-pomoćnički podskup stanica koje se razlikuju od Th1 i Th2 po sintezi različitih citokina i aktivaciji različitih nuklearnih faktora, s primarnom ulogom u razvoju autoimunih bolesti (133). Središnji je modulator Th17 stanične linije retinoična kiselina koja je povezana

s orfan nuklearnim receptorom (ROR) - yt (134). Th17 stanice uglavnom proizvode citokine označene kao IL-17, ali također i IL-17F, IL-21, IL-22 i faktor stimuliranja granulocitno-monocitnih kolonija stanica (GM-CSF) te potencijalno proizvode faktor tumorske nekroze (TNF) i IL-6 (135). Citokini koje proizvode Th17 stanice imaju učinak na mnoge vrste stanica i potiču proizvodnju mnogih proupalnih citokina i kemokina, putem receptora na površini membrana ciljnih stanica IL-17 receptora (IL-17R) koji čine zasebnu receptorsku citokinsku obitelj i koja uključuje IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD i IL-17RE (136). Funkcionalni receptori za IL-17 citokinsku obitelj često postoje u obliku heterodimera koji svoju aktivnost izražavaju signalizacijskim putevima koji uključuju NFκB, MAPK, C/EBP i Act1.

1.5.3.6. Uloga Th17 stanica u šećernoj bolesti tipa 1

Nekoliko je dokaza iz istraživanja životinjskih modela dijabetesa koji ukazuje na uključenost Th17 signalnog puta u patogenezi ŠBT1. U modelu autoimunog dijabetesa u NOD-u (non obese dijabetic) miševa zabilježen je porast aktivnosti IL-17A-e i IL-17F-a u Langeharsovim otočićima gušterače koji koorelira s razvojem inzulitisa (137). Eksperimentalno inhibiranje Th17 stanica značajno potiskuje razvoj dijabetesa (138). U IL-17 deficijentnih NOD miševa odgođen je početak pojave dijabetesa sa smanjenim znacima inzulitisa (139). U streptozotocinom potaknutom dijabetesu IL-23 potiče razvoj dijabetesa u tretmanu sa subdiabetogenim dozama streptozocina, potičući ekspanziju Th17 stanica (139). Pored toga, nedostatak IL-17A-e ublažava učinak streptozotocinom potaknutog dijabetesa (140). Sve navedeno jasno upućuje na ključnu ulogu Th17 stanica u razvoju autoimunog dijabetesa. MeĐutim, kako je vidljivo u drugim modelima autoimunih bolesti, uloga Th17 stanice u patogenezi i njihov odnos s Th1 stanicama u posredovanju i razvoju dijabetesa nije potpuno jasna. Istraživanja, naime, pokazuju da se antigen specifične Th17 stanice u otočićima, da bi bile u stanju izazvati dijabetes, trebaju prethodno pretvoriti u Th1-slične stanice, pri čemu je potrebna i suradnja Th1 stanica uz INF-y. Potvrda navedene teze o presudnoj ulozi Th17 signalnog puta u razvoju autoimunog dijabetesa istraživanja su u kojima je rađena blokada aktivnosti IL-17 putem IL-17 protutijela ili IL-25 protutijela. Studije na humanim modelima također podržavaju tezu o ključnoj ulozi Th17 puta aktivacije u razvoju ŠBT1. CD4 + T-stanice iz periferne krvi djece oboljele od ŠBT1 pokazuju povećanu proizvodnju IL-17 i IL-22 uz porast genske ekspresije Rorc2 i Foxp3 (141). Za istaknuti je da CD4 + T-cirkulirajuće stanice u pacijenata sa ŠBT1 proizvode IL-17 kada su aktivirane autoprotutijelima β-stanica, uključujući tu proinzulin, insulinoma povezani protein i GAD65 (142). Povećana razina IL-17 u ŠBT1 može se pripisati prisutnosti proupalnog citokinskog miljea koji usmjerava diferencijaciju stanica prema Th17

liniji. Doista, monociti iz ŠBT1 bolesnika spontano izlučuju bitno više razine IL-6 i IL-1β koji promiču IL-17 proizvodnju pomoću memorijskih CD4 + T- stanica (143). Ferraro i suradnici pružaju dokaze o poliklonskoj aktivaciji CD4 + T-stanica s memorijskim fenotipom iz limfnih čvorova gušterače (PLN) u pacijenata sa ŠBT1 koje otpuštaju povećane razine IL-17 kao odgovor na proinzulin i GAD65 (144). Stanice humanih Langerhansovih otočića izražavaju visoke razine IL-17RA-e, IL-17RC-a i IL-17, što upućuje na izravan toksični učinak IL-17 na β-stanice, a u sinergiji s IFN-y i IL-ip povećava ekspresiju SOD2, NOS2A-e i COX2 koji su uključeni u upalnom odgovoru kod inzulitisa. Nadalje, IL-17 inhibira ekspresiju BCL-2 gena koji inače dovodi do povećanja proapoptotskog učinka IL-ip/IFN-y na stanicama Langerhansovih otočića (141, 145).

1.5.3.7. Interakcija Th17 i Treg stanica u šećernoj bolesti tipa 1

Th17 i Treg stanice ontogenetski su dvije vrlo bliske podskupine CD4 + T-pomoćnčkih stanica čija različita diferencijacija ovisi o prisutnosti različitih količina TGF-β i odsutnosti ili prisutnosti određenih proupalnih citokina. Ravnoteža između T17 i Treg važna je u održavanju normalne kontrole imunoloških procesa. Neravnoteža ili disfunkcija Treg stanice može dovesti do razvoja autoimunih bolesti pa tako i autoimunog dijabetesa povećanjem ekspanzije i aktivnosti Th17 stanica (146). Tako je Ferraro otkrio da su širenje Th17 stanica i funkcionalni nedostaci u Treg stanicama prisutni u PLN-u kod ŠBT1 bolesnika (144). Chaudhry i suradnici izvijestili su da CD4 + Treg stanice upravljaju Th17 staničnim imunološkim odgovorom u životinjskih modela putem ekspresije Foxp3 gena vezanjem na STAT3 molekulu koja je ključan čimbenik u aktivaciji u pravcu Th17 diferencijacije (147). Prekomjerna ekspresija Foxp3 rezultira snažnom redukcijom IL17A genske ekspresije inhibiranjem RORyT posredovane IL-17A mRNA transkripcije (148). Ova opažanja podupiru tezu da smanjena ekspresija Foxp3 može dovesti do neispravne kontrole Th17 stanica. S druge strane, Th17 stanice neutraliziraju Treg stanice čime doprinose razvoju ŠBT1. Dokaz je istraživanje na NOD miševima tretiranim s anti-IL-17 antitijelima u kojih se bilježi porast broja Foxp3 + Treg stanica (149).

1.5.3.8. Interakcija crijevne flore i Th17/Treg stanica u šećerenoj bolesti tipa 1

Crijevna je flora jedan od važnih okolišnih čimbenika u razvoju ŠBT1. Mikroorganizmi koji nastanjuju ljudski organizam žive u simbiozi s domaćinom. Gotovo 100 triliona bakterija živi u ljudskom organizmu, nastanjuje najviše sluznicu crijeva i ima veliki utjecaj na razvoj imunog sustava kao i na razvoj i funkciju limfocita. Ljudski imuni sustav zauzvrat ima utjecaj

na sastav mikroorganizama crijeva (150). Nekoliko istraživanja na životinjskim modelima pokazalo je da mijenjanje bakterijskog sastava crijeva izaziva promjene u nastanku i napredovanju ŠBT1 (151, 152). Budući da je diferencijacija Th17 stanica i generacije Treg stanica pod utjecajem crijevnih bakterija, Ivanov je prvi dokazao ključnu ulogu crijevne komensalne flore u Th17 diferencijaciji stanica kod miševa tretiranih antibioticima (153). Tretman rezultira smanjenom diferencijacijom Th17 stanica u tankom crijevu lamina proprije s povećanim brojem Treg stanica. Ti podatci upućuju na zaključak da sastav crijevne bakterijske flore regulira ravnotežu T17 i Treg stanica i utječe na intestinalnu imunost. Kasnija su istraživanja identificirala segmentirane vlaknaste bakterije (SFB) kao najvažniju vrstu bakterija za induciranje Th17 diferencijacije (154, 155), dok su druge komenzalne bakterije i njihovi metaboliti poput masnih kiselina kratkih lanaca poticali diferencijaciju Treg stanica (156 − 158). Iznenađujuće, NOD miševi bez klica pokazuju značajno povećan broj Th17 i Th1 stanica u crijevu uz smanjen broj Treg stanica i ubrzani razvoj inzulitisa. Mada navedeni podatci govore u prilog patogene uloge IL-17/Th17 stanica u ŠBT1, nedavna istraživanja u NOD miševa ukazuju na zaštitni učinak T17 stanica u ŠBT1 kada se modulira crijevna flora (159 − 161). Biobreeding dijabetesu skloni (BBDP) i biobreeding na dijabetes otporni (BBDR) štakori pružaju brojne dokaze tome u prilog (162, 163). Dokazano je da se prijenosom Lactobacillus johnsonii soja N6.2 (LjN6.2) od BBDR do BBDP štakora prenosi otpornost na SBT1 kod BBDP štakora (164). U pokušaju rješavanja polemika u odnosu na patogene naspram zaštitnih učinaka SFB-a i Th17 stanica na razvoj ŠBT1, Kriegel je provela detaljno istraživanje o učestalosti dijabetesa u NOD miševa korelirajući incidenciju s razinom SFB kolonizacije i brojem Th17 stanica među NOD miševima smještenim u različitim okolišima. U ženki miševa koloniziranih SFB-om, incidencija je dijabetesa jednako niska (20

%), dok je 80 % onih bez SFB kolonizacije razvilo dijabetes ŠBT1. Broj Th17 stanica u SFB pozitivnih miševa u korelaciji je s razinom SFB-a u crijevima (161).

1.5.3.9. Nove terapijske mogućnosti u liječenju šećerne bolesti tipa 1

Trenutačno liječenje ŠBT1 temelji se na primjeni inzulina, no buduće će terapijske metode biti usmjerene na inhibiciju Th17 stanične diferencijacije pomoću rekombinantnog IL-25 koji ima protuupalna svojstva, a ne na blokadu samo jednog citokina, kao npr. IL-17. U posljednje je vrijeme veliko zanimanje za terapijsku učinkovitost nedavno otkrivenih molekula koje djeluju na RORt, kao što je npr. SR1001 selektivni RORa/y inverzni agonist u NOD miševa, koji pokazuje značajno smanjenje učestalosti dijabetesa i insulitisa u tretiranim mišjim modelima.

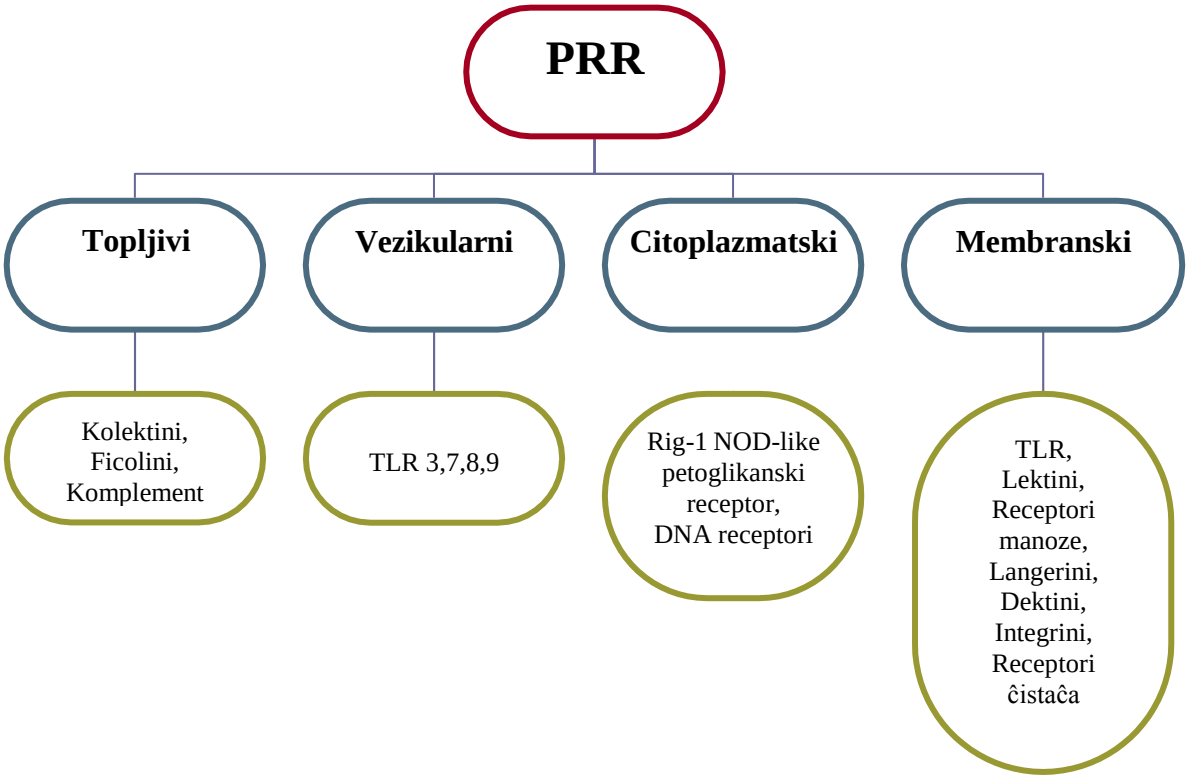
Osim toga, SR1001 smanjuje proupalnu ekspresiju citokina, osobito Th17-posredovanih citokina, smanjuje proizvodnju autoprotutijela i povećava broj Foxp3 + CD4 + Treg stanica (165). B7-H4-imunoglobulinski fuzijski protein (B7-H4.Ig) novo je identificirana signalna molekula za koinhibiciju T-stanica koja ima blokirajući učinak na razvoj dijabetesa u NOD miševa (166). Inhibicija imunoproteasomske podjedinice LMP7 pomoću ONX 0914 suzbija Th1 i Th17 i poboljšava diferencijaciju Treg-a (167). Zabilježeno je da je ubrizgavanje adjuvanata koji sadrže mikobakterijum kao bacil Calmette-Guerin (BCG) ili kompletan Freundov adjuvans (CFA) učinkovito u sprječavanju pojave autoimunog dijabetesa u NOD miševa pojačavanjem učinka regulatorne Th17 podskupine stanica čiji je supresijski učinak posredovan preko IL-10 i IFN-y (167).

Nadalje manipulacija sastavom crijevnih bakterija može također utjecati na ravnotežu Th17 i Treg stanica. Transferom crijevnih bakterija odraslih muških u crijeva nezrelih ženki NOD miševa postiže se snažna zaštita od ŠBT1 (168). Sličan učinak ima primjena *Cordyceps sinensisa*, parazitarne gljive koja je široko korištena u tradicionalnoj kineskoj medicini što je rezultiralo smanjenjem ukupne incidencije dijabetesa u NOD miševa zbog povećanja broja Treg-a u odnosu na Th17 stanice. Prehrana također može promijeniti sastav mikroorganizama i potencijalno utjecati na omjer i aktivnost Th17 i Treg stanica što je potvrđeno na mišjim modelima koji su hranjeni antidijabetogenom dijetom (sojina mliječna formula) koja je smanjila broj upalnih stanica Th17 i IL-23 u debelom crijevu (169). Ovaj je učinak vjerojatno rezultat promjena u crijevnoj bakterijskoj flori, stoga je cilj budućih istraživanja procijeniti hoće li strategije za modificiranje mikroorganizama crijeva moći zaustaviti ili odgoditi pojavu dijabetesa kod visoko rizičnih zdravih pojedinaca.

1.5.4. Citokini

Osnovna je funkcija imunološkog sustava prepoznavanje patogena, aktiviranje izvršnih mehanizama njihovog uništavanja te zaštita od oštećenja vlastitih tkiva. Otkrivanje ključnih mehanizama aktiviranja prirođenog imunosnog sustava sastoji se u istraživanju receptora za prepoznavanje strukturnih „predložaka– (PRR, engl. *patern recognation receptors*) čime je zapravo granica specifične i nespecifične imunosti na neizravan način uklonjena. Naime, aktivaciji efektorskih mehanizama prirođene imunosti prethodi receptorsko prepoznavanje molekularnih obrazaca povezanih s patogenima (PAMP, engl. *pathogen associated molecular patterns*). PAMP-ovi su molekule koje prepoznaju ograničeni broj receptora za prepoznavanje patogena (PRP, engl. *patogen-recognition receptors*) koji se mogu podijeliti u intracelularne receptore u koje osim NOD-u sličnih receptora (NLR, engl. *Node like receptors*) ubrajamo i

receptore za gene inducirane putem retinoidne kiseline (RLR, engl. *Rig like receptors*) i ekstracelularnu skupinu receptora poput Tollu-sličnih receptora (TLR, engl. *Toll like receptors*) (170). Aktivacija imunosnih stanica, npr. neutrofila, makrofaga i dendritičkih stanica, nastupa nakon interakcije receptora smještenih na membrani stanica i patogena, što rezultira lučenjem citokina i drugih medijatora upale s ciljem uklanjanja patogena. Efektorske stanice ujedno mogu biti i predočne jer im izražavanje specifičnih molekula na površini omogućuje predočavanje vrlo specifičnih struktura antigena limfocitima T i B te aktivaciju efektorskih mehanizama stečene imunosti. Dugo se smatralo da je poremećaj stečene imunosti ključan u patogenezi autoimunih bolesti zbog čega su istraživanja bila usmjerena na skupinu proupalnih citokina uključenu u imunosni odgovor, no danas je poznato da je tu bitna i aktivacija stanica prirođene imunosti koja ovisi o skupini molekula nazvanih alarmini. Uporište za navedenu tvrdnju pružaju nedavna istraživanja koja pokazuju da imunosni sustav može prepoznati ne samo egzogene čimbenike (PAMP) ili patogene nego i endogene signale opasnosti zvane alarmini ili molekule pridružene oštećenju (DAMP, engl. *damage associated molecular patterns*) (171). Do sada su rađena brojna istraživanja o ulozi navedenih DAMP molekula u razvoju brojnih bolesti, no većina radova o ulozi alarmina u ljudi obuhvaća mali broj ispitanika i odnosi se na mjerenja koncentracije alarmina u odraslih, dok su istraživanja na dječjoj populaciji rijetka. Postoji tek nekoliko radova rađenih na životinjskim modelima koji ukazuju na činjenicu da DAMP molekule ili alarmini imaju moguću ulogu u patogenezi autoimunih bolesti uključujući i ŠBT1. Noviji radovi ukazuju na to da DAMP ili alarmini, kao medijatori prirođene imunosti, doprinose oštećenju tkiva te se oslobađaju kao odgovor na oštećenje stanica, infekciju ili upalu i aktiviraju imunosne stanice putem TLR-a i RAGE-a koji predstavljaju receptore za prepoznavanje strukturnih „predložaka– (PRR, engl. *pattern recognition recep- tors*) koji integriraju signale DAMP ili PAMP (172) (Slika 1).



Slika 1. PRR (*Patern recognition receptors*)

Pored toga, istraživanja su dokazala važan utjecaj pojedinih citokina u razvoju ŠBT1 putem njihova sustavnog davanja, što ima dijabetogeni učinak, dok njihova neutralizacija ili izbacivanje citokinskih gena (pokusni mišji modeli bolesti) ima antidijabetogeni učinak. Općenito Th1 citokini (IL-2, INFy, TNF-α) uzrokuju razvoj bolesti, dok Th2 ili Th3 citokini (IL-4, IL-10, TGF-α) imaju zaštitni učinak. Prema tome, neravnoteža u imunosnom odgovoru može biti uzrok pokretanja autoimunog procesa (173). Stoga bi, vezano uz navedena istraživanja, analiza alarmina, koji se smatraju medijatorima prirođene imunosti, mogla doprinijeti rasvjetljavanju imunosnih karakteristika i etiopatogeneze autoimunog dijabetesa u djece.

1.5.5. Alarmini

Alarmini su skupina multifunkcionalnih, strukturno različitih endogenih molekula koje se pasivno otpuštaju iz nekrotičnih stanica prilikom oštećenja tkiva ili infekcije ili ih izlučuju epitelne stanice i stimulirani leukociti. Alarmini su snažni posrednici upale, koja je vitalni dio prirođene obrane domaćina. Upala se događa kao odgovor na infekciju ili neinfektivno oštećenje tkiva i uključuje regrutaciju fagocita, koji uklanjaju stanični debris i mikroorganizme nakon čega slijedi cijeljenje s regrutacijom drugih tipova stanica, uključujući endotelne stanice, da bi se ponovno uspostavila tkivna homeostaza. Ukoliko oštećenje tkiva ili infekcija nisu

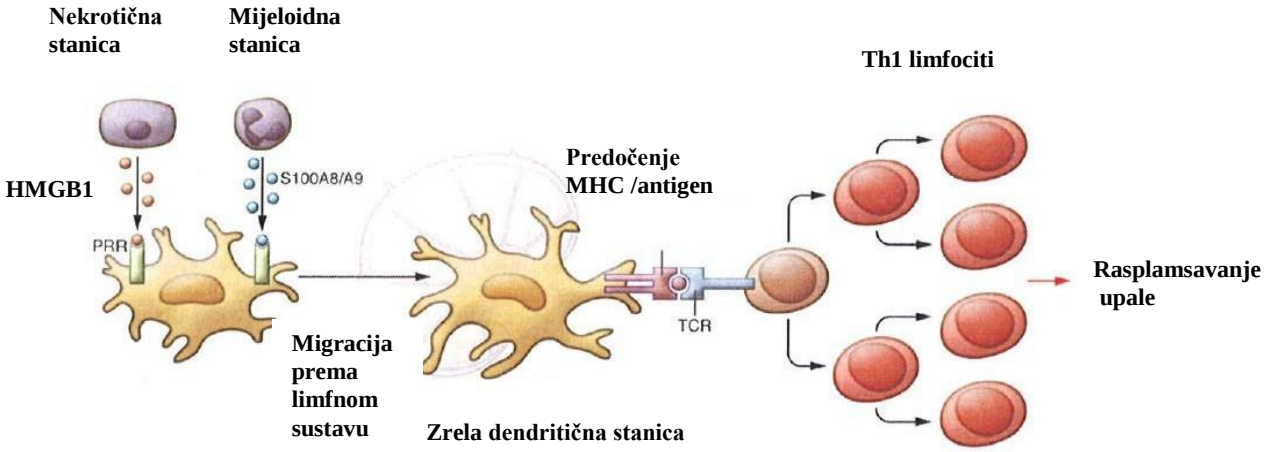
prisutni, alarmini imaju brojne druge uloge unutar stanice. No, nakon što jednom uđu u meustanični prostor, alarmini djeluju kao citokini i aktiviraju stanice prirođene imunosti te dovode do regrutacije antigen-prezentirajućih stanica pomoću prepoznavanja receptora za molekularne obrasce, kao što su receptori slični Tollu *(*TLR, engl. *Toll-like receptors)* (174). Ključna je sposobnost alarmina da pojačavanjem prirođenog imunosnog odgovora, kroz utjecaj na antigen prezentirajuće stanice, posredno djeluju na stečenu imunost povezujući stečeni i priroĐeni krak imunosnoga odgovora (175). U alarmine se ubrajaju proteini visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1, engl. *high mobility group box 1 protein*), proteini skupine S100 koji vežu kalcij (npr. S100A8, S100A9 i S100A12, engl. *calcium-binding proteins*), proteini toplinskog šoka (HSPs, engl. *heat-shock proteins*), fibrili amiloida-β, hijaluronski fragmenti i neki citokini IL1-α i IL-33 (176).

Zajedničke karakteristike alarmina vidljive su u sljedećem:

a) tijekom ozljede tkiva ili infekcije oni se naglo otpuštaju u međustanični prostor iz citoplazme (npr. S100A12) ili jezgre (npr. HMGB1) stanica koje odumiru
b) mogu ih oslobađati i žive stanice imunosnog sustava koristeći posebni sekretorni sustav ili preko endoplazmatskog retikuluma (ER) - Golgijev put sekrecije
c) aktiviraju stanice prirođene imunosti: neutrofile, makrofage, dendritičke stanice, ali također posredno ili neposredno aktiviraju i stečeni imunosni odgovor
d) sudjeluju u obnavljanju homeostaze tkiva nakon izravne ozljede ili sekundarnih učinaka upalnog procesa na tkivo (177).

1.5.5.1. Alarmini u patogenezi autoimunih bolesti

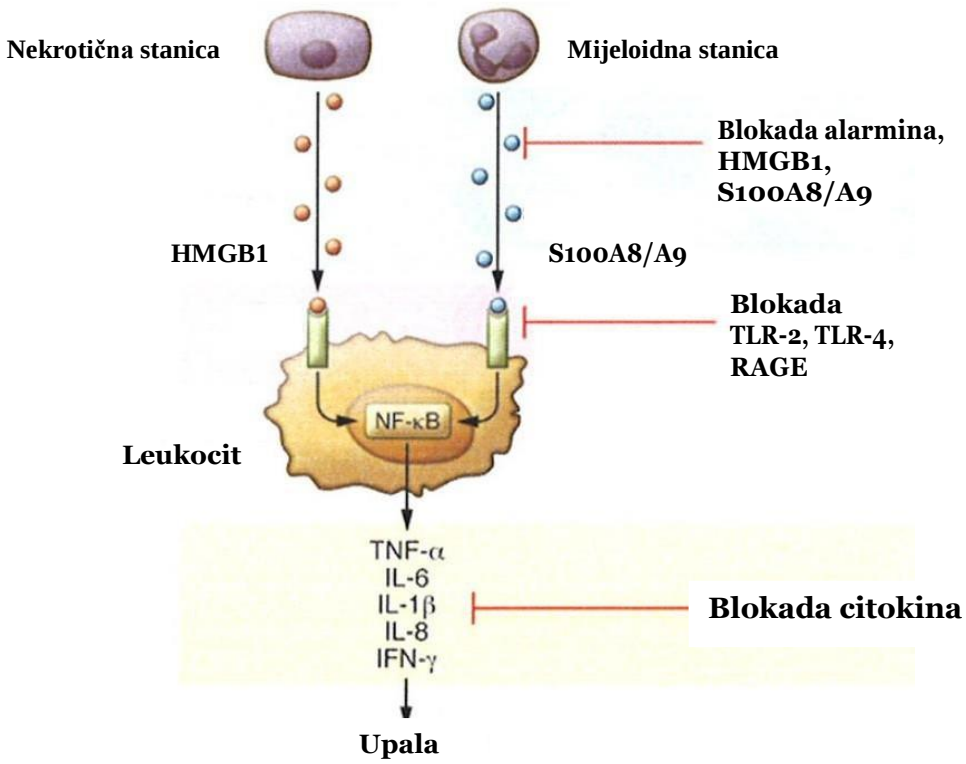
Alarmini sudjeluju u imunopatogenezi brojnih upalnih i autoimunih bolesti. Opisane su povišene razine alarmina u serumu u sistemskom eritemskom lupusu (61 − 64), reumatoidnom artritisu (178), Kawasakijevu vaskulitisu (179) i psorijazi (180), a takoĐer i u sepsi (181) te u aterosklerozi (182). Alarmini svoje učinke ostvaruju putem receptora za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (RAGE, engl. *receptor for advanced glycation end products*) te putem receptora sličnih Tollu (TLR, engl. *Toll-like receptors*), uključujući TLR2, TLR4 i TLR9 (183). Uloga je alarmina pojačavanje i podržavanje upalnoga procesa regrutacijom nezrelih dendritičnih stanica koje prenose antigene do sekundarnih limfnih organa, gdje ih predočavaju naivnim T-limfocitima te potiču stečeni imunosni odgovor (184, 185) (Slika 2).



Slika 2. Alarmini potiču kroničnu upalu i autoimunost reguliranjem stečenog imunosnog odgovora (preuzeto iz: Bobek i sur. 2014, uz odobrenje prof. Jelušić).

Alarmini regrutiraju nezrele dendritične stanice, induciraju njihovo funkcionalno sazrijevanje, potičući ih da prihvate antigene i dostave ih u sekundarne limfne organe, gdje će prezentirati antigenske epitope naivnim T limfocitima i poticati njihovu Th1 polarizaciju te potaknuti stečeni imunosni odgovor. Stalno oslobađanje alarmina kontrolira izražavanje MHC molekule tipa 1 i 2 te prezentaciju antigena, kao i nekontroliranu proliferaciju T limfocita, čime dovodi do pojačavanja upale.

Kontinuirano oslobađanje alarmina uzrokuje izražavanje MHC molekula, prezentaciju antigena i nekontroliranu proliferaciju T limfocita što dovodi do rasplamsavanja upale. U različitim upalnim stanjima pokazalo se da koncentracije pojedinih alarmina u serumu bolje koreliraju s aktivnošću bolesti i oštećenjem tkiva nego klasični pokazatelji upale, moguće zbog njihova lokalnoga otpuštanja u izravanom odgovoru na oštećenje tkiva (186). Osnova patofizioloških procesa mnogih bolesti je neregulirana upala, a otkriće pojedinih proupalnih citokina, čijom blokadom se postiglo učinkovito liječenje brojnih bolesti, dovela je do napretka u liječenju brojnih stanja kao npr. blokada TNF-α kod oboljelih kod reumatoidnog artritisa (187), no nažalost ne u svim stanjima kao npr. u sepsi (188). Naknadno otkriće alarmina kao posrednika upale, te aktivacijski put kojim djeluju putem specifičnih receptora, omogućila je alternativni alarminski put liječenja akutnih i kroničnih upalnih bolesti (Slika 3).



Slika 3. Prikaz alarminskoga puta kao moguće terapijske mete u upalnoj kaskadi priroĐene imunosti. U životinjskim su modelima alarmini izravno ciljani protutijelima ili kompetitivnim inhibitorima, npr. domena A (HMGB1), ili su ciljani receptori koji prepoznaju molekularne obrasce (PRR, engl. *patern recognation receptors*) s antitijelima ili topljivim "decoy" receptorima. Kratice: HMGB1 − protein visoke pokretljivosti iz skupine 1; S100A8/9 − proteini koji vežu kalcij S100A8/9; TCR − receptor T-limfocita; TLR − Tollu-sličan receptor; RAGE − receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije; TNF − čimbenik nekroze tumora (preuzeto iz: Bobek i sur. 2014, uz odobrenje prof. Jelušić)

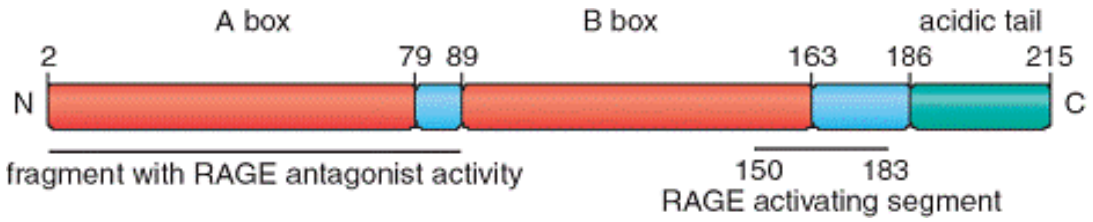
Citokinska blokada, uključujući TNF-α, klinički je korisna u liječenju kroničnih upalnih bolesti, ali nije učinkovita u svih bolesnika. Stoga se danas terapija usmjerava na blokadu proupalnih svojstava alarmina koji pružaju novi pristup u imunoterapiji uzvodno od TNF-α i NF-kB aktivacije (189). S obzirom na to da anti-TNF-α terapija nije pokazala nikakav utjecaj na aktivnost HMGB1 (190), zaključeno je da djelovanje alarmina HMGB1 nije ovisno o TNF-α (191), dok su protutijela protiv HMGB1 i antagonisti A-domene molekule HMGB1 uspješno spriječili razvoj sinovijalne upale u životinjskim modelima artritisa (192). Vezanje HMGB1 s drugim endogenim molekulama, kao što je nukleosom, poništava imunosnu toleranciju i doprinosi razvoju autoimune bolesti (193). Stoga su alarmini privlačne mete u liječenju RA-e i drugih kroničnih upalnih bolesti, naročito kod pacijenata koji ne reagiraju na anti-TNF-α terapiju. Iako trenutno ubrzano raste popis alarmina u literaturi, najbolje su proučeni u zdravih i bolesnih ljudi HMGB1 te proteini iz skupine S100 koji vežu kalcij.

1.5.5.2. Protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1)

HMGB1 otkriven je 1973. g. u stanicama sisavaca u skupini proteina velike pokretljivosti (HMG od engl. *high mobility group*) koji su ime dobili zbog svog svojstva visoke elektroforetske mobilnosti u poliakrilamidnom gelu, a obilno je izražen i u gotovo svim ljudskim stanicama. U početku poznat kao protein nuklearne strukture s funkcijama vezivanja i savijanja DNA-e, naknadno je otkrivena njegova uloga u staničnoj replikaciji, transkripciji, rekombinaciji i popravcima DNA-e. Međutim, ne samo da su njegove nuklearne ili unutarstanične funkcije postale predmetom zanimanja nego su dokazane višestruke izvanstanične interakcije s učincima na imuni sustav i ulogom kod autoimunih bolesti, upala i održavanja homeostaze tkiva. Korelacija izvanstanične razine HMGB1 i imunološke aktivnosti odgovarajuća je aktivnosti bolesti, stoga bi HMGB1 mogao biti koristan alat u dijagnostici, praćenju i procjeni terapijskog učinka u pojednim bolestima (194).

1.5.5.3. Struktura HMGB1

HMGB1 mali je protein sastavljen od 215 aminokiselina čija se genetska sekvenca nalazi na kromosomu 13q12 i sastoji od 10 000 parova baza (195, 196). Strukturno je organiziran u tri različite podjedinice (domene): A i B-domene i negativno nabijenom kiselom C-terminalnom repu dugom 30 aminokiselina (197, 198). Iako je tercijarna struktura dvaju domena dobro poznata, cjelovitu strukturu HMGB1 teško je definirati, jer je nestabilnost koja je potrebna za mnoge interakcije dovela do mnoštva mogućih konformacija molekule (199), no najčešće su tri α-uzvojnice konfigurirane u obliku slova L (200) (Slika 4).



Slika 4. Struktura HMGB1. HMGB1 organiziran je u tri različite domene, dvije HMG domene (A i B) i kiseli C -terminalni rep (preuzeto iz: Bobek i sur. 2014, uz odobrenje prof. Jelušić)

A i B domene vežu se ovisno o sekvenci s posebnim afinitetom na pojedine dijelove DNA-e, što može izazvati promjenu strukture u pravcu savijanja ili odmotavanja DNA-e (198, 201). Dok A-domena igra važnu ulogu u prepoznavanju oštećenih dijelova DNA-e, za B se podjedinicu smatra da je nosilac proupalne sekvence, s obzirom na to da oblikuje imuno-aktivan kompleks CpG-A-oligonukleotide, dok je uloga C-terminalnog repa sudjelovanje u intra- i intermolekularnim interakcijama s histonima ili nukleosomima (198). Ekspresija HMGB1 u tkivima regulirana je mnoštvom različitih čimbenika poput p53 i c-myc, poznatih po važnoj ulozi u apoptozi i rastu tumora (202). Posttranslacijska acetilacija, metilacija i fosforilacija dovode do nuklearne aktivacije i raspodjele na brojne stanične odjeljke (203, 204). Unutarstanična koncentracija HMGB1 uvelike se razlikuje u različitim tkivima s ekspresijskim stopama koje variraju i do 100 puta između različitih tkiva (205). Ekspresija negativno korelira s diferencijacijom tkiva, što podupire ideju o HMGB1 kao izvrsnom biomarkeru kod nediferenciranih malignih tumorskih tkiva (206).

1.5.5.4. Funkcije HMGB1

Funkcije HMGB1 mogu se podijeliti na unutarstanične i izvanstanične. HMGB1 ostvaruje mnoge funkcije vezanjem za membranski RAGE receptor. RAGE je transmembranski receptor sa samo malim unutarstaničnim dijelom i služi kao receptor za prepoznavanje uzoraka (PRR), a dio je signalnih puteva aktivacije u upali, autoimunim bolestima i malignim procesima. Ekstracelularni topivi tip RAGE-a (sRAGE) postoji u cirkulaciji, odgovara izvanstaničnoj domeni RAGE-a (bez unutarstanične i transmembranske domene membranskog RAGE-a) izveden iz alternativnog spajanja ili proteolitičkog cijepanja membranskog RAGE-a. Topivi se RAGE može vezati na cirkulirajući HMGB1 i spriječiti njegove izvanstanične funkcije, tj. djeluje kao receptor mamac za HMGB1 (207) te stoga nije jednostavan receptor jer djeluje i kao neka vrsta adaptera (208). Razine RAGE-a obično su snižene u različitim autoimunim bolestima kao što su Kawasakijeva bolest i sistemski lupus (209, 210).

Tablica 3. Fiziološke i patološke funkcije HMGB1

Alarmin podrijetlo	**HMGB1** Sve vrste stanica, uključujući imunosne stanice (nehistonski nuklearni protein)
Unutarstanična fiziološka funkcija	Regulacija transkripcije DNA-e
Izvanstanični učinci	Proupalni odgovor (kada se veže za druge DAMPs-e, npr. LPS, IL-β1, DNA-u i RNA-u): kemotaksija, proliferacija i diferencijacija imunosnih i predočnih stanica
Načini oslobađanja	a) pasivno otpuštanje iz nekrotičnih stanica b) tijekom apoptoze HMGB1 oksidiran je na Cys106, čineći ga tolerogenim više nego proupalnim c) aktivno izlučivanje alternativinim putem (ne preko Golgijevog aparata): HMGB1 prolazi kroz nekoliko oblika posttranslacijske modifikacije, npr. acetilaciju, fosforilaciju, metilaciju
Receptori	TLR2, TLR4, RAGE
Uključene bolesti	Akutna trauma i slična stanja: sepsa, ishemijsko oštećenje mozga, ishemijsko reperfuzijsko oštećenje srca, transplantacija organa Kronična stanja: artritisi, SLE, MS, T1DM, epilepsija, karcinom
Regenerativni potencijal	Srčana regeneracija, revaskularizacija, cijeljenje rana kože, kosti, mišića, regeneracija živaca

1.5.5.5. Unutarstanične funkcije HMGB1

Unutarstanične funkcije HMGB1 izvorno su otkrivene unutar nuklearnog odjeljka gdje je tijesno vezan uz kromatin sudjelujući u regulaciji savijanja DNK-a. HMGB1 posreduje u bitnim nuklearnim procesima kao sto su transkripcija, rekombinacija, replikacija i popravci DNK strukture. Po svojoj unutarnjoj funkciji savijanja kromatina, HMGB1 može približiti udaljene regulacijske sekvence i poboljšati vezivanje faktora transkripcije na određene promotore gena (211). Karakteristične aminokiselinske sekvence na C-terminalnom repu HMGB1 imaju veliku ulogu u poticanju transkripcije, no i u regulaciji funkcije HMGB1 (212). HMGB1 pojačava afinitet vezivanja mnogih sekvencijski-specifičnih proteina na DNK-u, ali isto tako aktivira transkripciju direktnim vezivanjem na nukleosome (213) ili interakcijom s kompleksom TATA-domene [60]. Među ostalim transkripcijskim faktorima koji su pod utjecajem HMGB1 nalaze se tumor supresorski faktori p53, p73 i NF-kB (214 − 216). Klizanje nukleosoma poboljšava se preoblikovanjem kromatina iskrivljene DNK-a, što dovodi do poboljšanja afiniteta vezanja remodelirana nukleosomna kompleksa ACF-a. Poboljšanje klizanja nukleosoma također je važno kod popravka DNK-a jer osigurava pristup

faktorima pregradnje kromatina u oštećenim sekvencama. Nadalje, HMGB1 može olakšati prepoznavanje oštećenja DNK-a određenim proteinima popravljačima koji se vežu s višim afinitetom za iskrivljeni DNK (217). Složenim vezivanjem za proteine popravljače, HMGB1 ubrzava popravak izrezivanjem dijela nukleotida indukcijom NER proteina (NER od engl. *Nucleotife excision repair*) (218). Promjenom baznog cijepajućeg popravljača BER (BER od engl. *Base excision repair*) proteinskim interakcijama s pripadajućim enzimima, HMGB1 igra važnu ulogu u održavanju genomske stabilnosti. Nasuprot tome, smanjen učinak BER-a uz učestalo ponavljanje CAG sekvenci dovodi do razvoja tumorskih stanica ili neurodegenerativnih procesa. HMGB1 nadalje ima ulogu u održavanju nuklearne homeostaze i poticanju odgovora na stres autofagijom (219). Mehanizam je regulacije apoptoze nasuprot autofagije u zaštiti autofagijskih proteina becil1 i ATG5 od kalpainom posredovanog cijepanja citosolnog HMGB1, čime je inhibirano stvaranje proapoptotskih fragmenata (220). Translokacija HMGB1 iz jezgre do citosola inducirana je raznim signalima, kao što je nakon alkiliranja DNK oštećenja aktivirana poli-ADP-ribozna polimeraza (PARP-1) (221). U aktiviranim je monocitima citosolni HMGB1 acetiliran i fosforiliran, inhibirajući time svoju ponovnu aktivnost u jezgru i dovodeći do akumulacije u citoplazmi (174, 222).

1.5.5.6. Stanično izlučivanje HMGB1

HMGB1 pasivno se oslobađa iz nekrotičnih ili oštećenih stanica ili ga aktivno izlučuju stanice imunološkog sustava (monociti, makrofagi, dendritične stanice), tumorske ili tkivne stanice pod hipoksičnim uvjetima (223). Dok je pasivno otpuštanje HMGB1 iz nekrotičnih ili oštećenih stanica poznato kao "imunogeno", s naknadnom aktivacijom imunološkog sustava, za apoptozu se pretpostavlja da je "imunološki tihi" proces degradacije na fiziološki i regulirani način, bez oslobađanja HMGB1 (224). Međutim, kod različitih tipova stanica, otpuštanje HMGB1 uočeno je i iz apoptotičkih stanica bez znakova nekroze (225). Aktivna sekrecija HMGB1 potaknuta interakcijom receptora stanične membrane s izvanstaničnim molekulama ili s hipoksijom javlja se postupno (226, 227), dok se pasivno oslobađanje potaknuto nekrozom javlja odmah. Aktivno izlučivanje HMGB1 podrazumijeva otpuštanje iz jezgre u citoplazmu sekretornih lizosoma, organela u kojima dolazi do acetilacije i fosforilacije HMGB1, koji se potom nakuplja u citoplazmi jer je njegov ponovni ulazak u jezgru blokiran (222). Citoplazmatski HMGB1 dolazi u sekretorne lizosome hematopoetiskih stanica koji se zatim spajaju sa staničnom membranom i egzocitozom oslobađaju sadržaj

iz stanice. Novije studije pokazuju da se većina HMGB1 otpušta tijekom prvih 18 sati nakon aktivacije, dok je naknadno otpuštanje HMGB1 rezultat sinteze novih proteina (228). Blokiranje autofagije u umirućim stanicama dovodi do unutarstanične retencije HMGB1 (229), kao i do nekoliko oblika poslijetranslacijske modifikacije kao što su fosforilacija, metilacija i acetilacija, koje rezultiraju nakupljanjem HMGB1 u citosolu (204, 222). Redoksno stanje izvanstaničnog HMGB1 predstavlja važan čimbenik jer redoks oblik inducira autofagiju, dok oksidirani oblik HMGB1 potiče apoptozu. Ovi mehanizmi igraju važnu ulogu u rezistenciji na lijekove u malignih oboljenja (230). Regulacija redoks stanja postiže se unutarstaničnom aktivacijom kaspaze i oslobađanjem radikala kisika (231). Za vrijeme apoptoze HMGB1 ostaje vezan s nuklearnim DNK-om i u tom se kompleksu otpušta s nukleosomima. Ovaj kompleks ima imunogena svojstva kada se veže i pri tome aktivira TLR-2 receptore (193). Makrofagi i dendritičke stanice aktivno oslobaĐaju HMGB1 nakon stimulacije apoptotičnih stanica endotoksinima, interleukinima ili TNF-om (228, 232). U dendritičkim je i nekim drugim imunološkim regulatornim stanicama HMGB1 translociran u vezikule prije otpuštanja u neklasičnom putu sekrecije (233). U hipoksičnih hepatocita aktivno izlučivanje HMGB1 regulirano je putem TLR4 i ROS-ovisnim putem, uključujući inhibiciju kalcijem/kalmodulinu ovisnih kinaza (234).

1.5.5.7. Izvanstanične funkcije HMGB1

Oslobođen u izvanstaničnom prostoru, HMGB1 može se vezati za mnoštvo receptora i izvršiti funkciju signalne molekule opasnosti, odnosno DAMP molekule. Vezivanjem na svoj prvi identificirani receptor RAGE, HMGB1 može aktivirati različite unutarstanične signalne putove, kao što su RAS-RAF-MAP ili Rb2F, koji su važni u regulaciji transkripcije i sintezi citokina (235). Sinergijskim djelovanjem HMGB1-RAGE-a nezrele se dendritičke stanice usmjeravaju u limfne čvorove, gdje se odvija proces razvoja i sazrijevanja Th1 stanica (236). U interakciji TLR-9 s jednolančanim oligonukleotidima (CpG-ODN) RAGE tvori kompleks s CpG-ODN i HMGB1, koji pojačava prezentaciju CpG-ODN-a na TLR-9 i time ubrzava proizvodnju citokina (237, 238). Nadalje RAGE interakcionira u vezanju HMGB1 na TLR-2 ili TLR-4, što dovodi do aktivacije p53-MDM-puta, a što je glavno međudjelovanje triju različitih signalnih puteva aktivacije (235). Tolu-slični receptori TLR-2, TLR-4 i TLR-9 također su važni partneri vezanja za HMGB1 i aktivacije imunogene funkcije, kao i interleukin receptor IL-1 i CD24. Vezivanje na TLR-2 aktivira HMGB1 u kompleksu s nukleosomima, što dovodi

do povećanog otpuštanja proupalnih citokina IL-1 beta, IL-6, Il-10, kao i povećane ekspresije MHC-a klase II, TNF-alfa, kostimulatornih CD86 i maturacijskog markera dendritičkih stanica CD83. Otpuštanje HMGB1 nukleosomnog kompleksa najčešće se javlja kod apoptoze ili sekundarne nekroze, kada je HMGB1 još uvijek čvrsto vezan uz kromatin. Pasivno oslobođen HMGB1 iz nekrotičnih stanica brzo se odvoji od kromatina i djeluje isključivo kao molekularni uzorak povezan s opasnošću (DAMP) (91) dok primarna apoptoza minimalno ili nikako ne doprinosi osobađanju HMGB1 u izvanstanični prostor. Znatna količina nuklearnog HMGB1 čvrsto je vezana za hipoacetilirani kromatin, koji se generira tijekom programirane stanične smrti (224). Međutim, apoptotične stanice koje nisu ispravno eliminirane mogu proći sekundarnu nekrozu, što dovodi do kasnog otpuštanja HMGB1 (239). HMGB1 stimulira adheziju i migraciju neutrofila i makrofaga te potiče njihovo izlučivanje proupalnih citokina, poput IL-1, IL-6 i TNF-a (240, 241), a zauzvrat, TNF, interferon, IFN-y i IL-1 stimuliraju makrofage na izlučivanje HMGB1 (242), stvarajući tako pozitivnu povratnu informacijsku petlju**.** Aktivacija TLR-4 postiže se dvama različitim mehanizmima: samim HMGB1, kao što je slučaj u dendritičnim stanicama u kojima interakcija HMGB1-TLR-4 potiče prezentaciju antigena inhibiranjem antigenske razgradnje kroz fuziju fagosoma i lizosoma (243), a nasuprot tome mogućnost je vezanja HMGB1 za agregate lipopolisaharida (LPS), što dovodi do vezanja kompleksa lipopolisaharida i CD14, što nadalje dovodi do stvaranja većih količina TNF-alfa u usporedbi sa stimulacijom samim HMGB1 ili samim lipopolisaharidima (244). Aktivacijom TLR-9/CpG-ODN-a potaknuta je proizvodnja citokina preko HMGB1/RAGE/CpG-ODN kompleksa (237). U hepatocelularnom karcinomu HMGB1 se veže na mitohondrijski DNK, otpušta iz hipoksičnih stanica i promovira rast tumorskih stanica aktivacijom TLR-9 (245). Pored toga u lupus nefritisu samo izvanstanični, ali ne i unutarstanični HMGB1 potiče patološki imuni odgovor aktivacijom makrofaga na vlastiti DNK preko TLR-9 (246). Općenito HMGB1 promiče imunosnu stimulaciju kada je kompleksno vezan za proupalne komolekule, dok samostalno HMGB1 smanjuje imunološki odgovor i poboljšava procese popravka tkiva (247).

1.5.5.8. Metode mjerenja HMGB1

HMGB1 se može detektirati pomoću sendvič ELISA-e (enzimski povezani imunosorbentni test), Western Blot tehnike ili EMSA-e (ispitivanje pomaka elektromobilnosti). Detekcija ELISA-om jednostavna je za izvođenje, isplativa i česta metoda za kvantifikaciju HMGB1 u kulturama stanica, međutim, razine HMGB1 u serumu niže su u usporedbi s Western Blot

metodom. To može biti posljedica utjecaja autoprotutijela, lipopolisaharida ili IL1-β koji inhibiraju prepoznavanje HMGB1 (248), no predobrada perklornom kiselinom neutralizira učinak navedenih čimbenika i omogućuje točnost mjerenja.

U Western Blot detekciji predobrada serumskih uzoraka SDS-om neutralizira učinake tzv. pozadinskih proteina čime doprinosi točnosti izmjerenih vrijednosti (249). U rutinskim se kliničkim ispitivanjima Western Blot metoda rijetko koristi zbog skupoće i duljine trajanja analize.

Metoda ispitivanje pomaka elektromobilnosti (EMSA) koristi posebne kapacitete vezanja HMGB1 na radioaktivno obilježene DNK sekvence, nakon čega se elektroforezom analiziraju obilježeni kompleksi HMGB1/DNK-a. Mada metoda minimizira učinak pozadinskih proteina, što pridonosi točnosti mjerenja, trošak rada sličan je Western Blotu, a i priprema radioaktivnih markera komplicira detekciju, zbog čega se ova metoda rijetko koristi u rutinskom radu (250).

1.5.5.9. Uloga i klinička važnost cirkulirajućeg HMGB1 u autoimunih bolesti

Kroz svojstva imunološkog moduliranja, HMGB1 igra važnu ulogu u autoimunim bolestima poput reumatoidnog artritisa i sistemskog lupusa, kao i kod akutnih upalnih stanja poput sepse i traume. Redoksno stanje HMGB1 utječe na unutarstaničnu funkciju u pravcu aktivacije apoptoze ili autofagije (230). Blokiranje aktivacije autofagije induciranjem transkripcije HSPp1 proteina regulatora dinamike aktina citoskeleta (251) ili vezivanjem beclin1 proteina, dovodi do inicijacije i održavanja autofagije (252). Pored toga, HMGB1 vezanjem za RAGE-a aktivira navedeni receptor koji potom olakšava unos DNK-a u endosome i prezentiranjem TLR.9 receptorima utječe na modulaciju autoimunog odgovora (253). Kompleks HMGB1/nukleosom oslobođen nakon aptoptoze stanica u sistemskom lupusu, može izazvati karakterističan anti-dsDNA i antihistonski odgovor (193), pri čemu je razina HMGB1 u plazmi značajno različita u aktivnoj bolesti u usporedbi sa zdravim kontrolama. U lupusnom se nefritisu pokazalo da su razine HMGB1 značajno povišene, što također korelira s kliničkim značajkama kao što je prateća proteinurija (251). U istraživanju sa 116 djece oboljele od sistemskog lupusa ili juvenilnog idiopatskog artritisa, svi su pacijenti pokazali značajno više serumske razine HMGB1 uz značajno niže razine sRAGE-a u usporedbi s 27 zdravih kontrola. Visoke razine HMGB1 također su povezane s hepatosplenomegalijom ili sinovitisom u juvenilnom reumatskom artritisu. U životinjskih je modela s umjetno induciranim artritisom HMGB1 detektiran u nuklearnim, citoplazmatskim i vanstaničnim

odjeljcima, dok je u zdravih kontrola prisutan samo vezan u jezgri stanica. U prilog tome govore i druga istraživanja kod oboljelih od reumatskog artritisa u kojih je vanstanični HMGB1 otkriven i u sinovijalnoj tekućini u 14 od 15 bolesnika (254), kao i istraživanje Goldsteina i sur. koji su otkrili značajno više razine serumskog HMGB1 u oboljelih u odnosu na zdrave kontrole (255). Razine HMGB1 također su bile značajno povišene u antineutrofilnom citoplazmatskom protutijelu (ANCA) koje je povezano s vaskulitisom u aktivnoj, u odnosu na neaktivnu ili reemisijsku fazu bolesti, što je pokazatelj aktivnosti upale. Sličan je rezultat dobiven u podgrupi s Wegenerovom granulomatozom, mikroskopskim poliangitisom i Churg-Straussovim sindromom (256). Nadalje, u istraživanju 42 pacijenta koji boluju od Bečetove bolesti, razine serumskog HMGB1 također su bile značajno povišene u odnosu na zdrave kontrole, međutim nisu bile povezane s aktivnošću bolesti (257). No ne samo u autoimunih bolesti nego i u akutnim upalnim stanjima kao što su „sustavni sindrom upalnog odgovora– (SIRS) razine su HMGB1 povišene, kao i kod bolesnika nakon velikih gastrointestinalnih kirurških zahvata kod operacija karcinoma probavnog trakta, gdje su povišene razine koorelirale s duljinom trajanja SIRS-a i plućne disfunkcije (258). Cohen i suradnici izvijestili su o povišenoj razini HMGB1 u plazmi već 30 minuta nakon teške traume, pri čemu je razina bila u korelaciji s težinom ozljede, sustavnog upalnog odgovora, posttraumatskih poremećaja koagulacije i aktivnosti komplementa (259). Wang i sur. izmjerili su povišenu razinu HMGB1 u bolesnika s tupim traumama prsišta uz znatno više vrijednosi u slučaju razvoja komplikacija kao multipla zatajenja organa ili sepsi, što je ujedno značilo i lošiji ishod (260). Nakon opekotina razine HMGB1 u plazmi koreliraju s veličinom spaljene površine tijela i pokazalo se da su općenito povišene rano nakon traume (261). U svim vrstama traume razine HMGB1 u cirkulaciji mogu odražavati stanično oštećenje, ali i višestruku upalnu aktivnost (262).

Zaključno, HMGB1 vrši mnoštvo funkcija u imunološkoj modulaciji u mnogim akutnim i kroničnim bolestima, a naročito u traumi, akutnim upalnim stanjima i autoimunim bolestima. U malignim bolestima HMGB1 igra važnu ulogu u stvaranju protuupalnog mikroekološkog prostora koji promiče rast tumora, i to moduliranjem djelotvornog antitumorskog imunog odgovora te poticanjem angiogeneze i pojave metastaza. Zbog prisutnosti malih, ali mjerljivih količina u krvi, HMGB1 lako se može koristiti kao klinički biomarker u predviđanju, prognozi, praćenju terapije i postavljanju dijagnoze. Mjerenjem prije provošenja specifične terapije pokazalo se da visoke razine HMGB1 u serumu uz niske razine sRAGE-a nose nepovoljne prediktivne i prognostičke informacije u malignih oboljenja. Zbog uključenosti HMGB1 u regulaciju imunološkog sustava, poseban fokus budućih istraživanja bit će na

relevantnosti cirkulirajućeg HMGB1 i njegovih podskupina vezano uz stratifikaciju i praćenje novih imunomodulatornih terapija u malignih i autoimunih bolesti.

1.6. ULOGA MIKRONUTRIJENATA/ ELEKTROLITA U RAZVOJU ŠEĆERNE BOLESTI TIPA 1

Iako se smatra da pravilnom ishranom osiguravamo dostatan unos minerala, pojedina životna razdoblja, kao što su intenzivno bavljenje sportom, pubertet, trudnoća i dojenje, menopauza, stanja poslije prijeloma, trauma i obilnih krvarenja, znatno utječu na metaboličke potrebe organizma. Kao i vitamini, minerali se ugrađuju u anorganske tvari od kojih je sačinjeno 5 % organizma. Kao i vitamine, i minerale moramo unositi hranom jer ih organizam ne može sintetizirati sam. Minerale dijelimo u makroelemente, koje trebamo u većim količinama (natrij, kalij, kalcij, sumpor, magnezij, klor, fosfor) te mikroelemente ili minerale u tragovima (bor, molibden, selen, krom, bakar, cink, željezo, fluor, mangan), koji su nam potrebni u količinama manjim od 100 mg/dan. Nakon što se apsorbiraju, minerali postaju dio strukture tijela: stanica, enzima, hormona, krvi i kostiju. Pohranjujemo ih u raznim dijelovima tijela, naročito u kostima i mišićnom tkivu. Važni su za održavanje adekvatne količine tekućine u organizmu. Budući da se minerali svakodnevno gube iz organizma (znojenje, probava), potrebno je nadoknaditi ih. Veći manjak pojedinih minerala može se zamijetiti kod pojedinaca koji prakticiraju dijetu ili troše lijekove, vegetarijanaca, trudnica, starijih osoba, pojedinaca koji češće konzumiraju prerađenu hranu i gotova jela te u slučaju neredovite prehrane i preskakanja obroka.

1.6.1. Cink

Cink (Zn) je vrlo važan element u tragovima jer se nalazi u gotovo svakoj tjelesnoj stanici i ima važnu ulogu u našem organizmu. U prirodi dolazi samo u spojevima. Otkrio ga je Andreas Marggraf 1746. godine i drugi je element u tragovima u organizmu nakon željeza. Uravnoteženom prehranom dnevno unosimo od 8 do 14 mg cinka. Cink je jedan od mikroelementa koji je potreban u maloj količini. U tijelu se nalazi u koncentraciji od 1,3 do 2,3 g. Pretežito se nalazi u stanicama. U obliku kompleksa s proteinima nalazi se u gotovo svim organima, naročito u prostati, bubregu, jetri, slezeni, plućima, gušterači, mozgu, mišićima i koži. Prisutan je i u tjelesnim tekućinama: želučanome soku, slini, žuči, znoju i krvnom serumu. Dnevno se normalnom prehranom unosi 10 do 15 mg cinka, najviše kroz

hranu bogatu bjelančevinama (meso, riba, mahunarke, mlijeko i mliječni proizvodi) (263). Potrebe za cinkom izražene su u:

- procesu sinteze proteina i kolagena
- rastu i razvoju novih stanica
- održavanju strukture molekule RNA
- poboljšanju funkcije mozga
- poticanju proizvodnje i izlučivanja inzulina u gušterači
- ubrzavanju cijeljenja rana
- skraćivanju trajanja virusnih infekcija
- jačanju imunološkog sustava
- smanjivanju kolesterola
- utjecaju na razvoj i rast reproduktivnih organa
- smanjivanju taloženja teških metala u organizmu.

Cink je ključan za aktivaciju brojnih enzima u organizmu: RNA polimeraze, alkalne fosfataze, laktat dehidrogenaze, a također pomaže apsorpciju kalcija te je sastavni dio alkalne fosfataze. Nužan je i za stvaranje soli žučnih kiselina. Preporučena je dnevna doza za odrasle 15 mg. Cink je snižen kod pušača zbog prisutnosti kadmija u duhanskome dimu, ali i kod trudnica, alkoholičara, dijabetičara, u slučaju poremećaja apsorpcije kod nekih crijevnih bolesti te u stanjima nakon operativnih zahvata. Velike potrebe za njim imaju sportaši, kao i aktivni rekreativci, jer se cink pojačanije troši tijekom treniranja.

Nedavna istraživanja pokazuju kako neki esencijalni elementi imaju imunomodulacijske osobine te se tako mogu uključiti u pokretanje autoimunosnog procesa. Cink je esencijalni element u tragu i uključen je u mnogo različitih staničnih procesa u organizmu (264). Već se duže vrijeme smatra kako postoji povezanost cinka s funkcijom gušterače i šećerne bolesti, stoga je važno naglasiti njegovu ulogu u razvoju ove bolesti (265). Na životinjskim modelima dokazan je inzulinomimetski i antidijabetogeni učinak cinka, koji je posljedica utjecaja na transport glukoze, sintezu glikogena, lipida i inhibicije glukoneogeneze i lipolize (266). Inzulin je peptidni hormon građen od 51 aminokiseline, oblikuje amiloidne fibrile u sekretornim granulama i gusto je pakiran zajedno s ionom cinka u heksamerne kristale koji osiguravaju osmotsku stabilnost vezikula i preveniraju razgradnju peptida. Nakon oslobađanja iz β-stanica gušterače inzulin se cijepa u aktivni monomer ovisno o pH- vrijednosti. Uloga iona cinka, koji se luči zajedno s inzulinom, inhibicija je cijepanja u aktivni oblik monomera pri fiziološkoj pH-

vrijednosti (7,3), dok kod niže vrijednosti pH (5,5) ona progresivno slabi (267). Zadnja istraživanja pokazuju da ion cinka može suprimirati cijepanje i oslobađanje inzulina u cirkulaciju, stoga se postavlja pitanje može li krivo strukturirani oligomerni međuprodukt inzulina, osobito u stanjima deficita cinka, inducirati stvaranje protutijela na inzulin koji vodi u oštećenje β-stanica i razvoj autoimunog dijabetesa (268). Prema tome, može se reći kako cink ima važnu ulogu u imunološkom sustavu, bitan je u sintezi i aktivaciji peptida timulina koji potiče sazrijevanje pomoćničkih limfocita T, a visoko je osjetljiv na manjak cinka. Imunomodulacijska uloga cinka očituje se u upalnom kraku imunosti i to tako što cink protein A20 koji se veže na TNF receptor inhibira fosforilaciju NF-κB-a smanjujući time ekspresiju TNF-α, IL-1β i IL-8. Stoga adekvatan unos cinka smanjuje aktivnost cikličke nukleotid-fosfodiesteraze pojačavajući učinak cikličke nukleotid-gvanozinmonofosfataze koja aktivira protein kinazu A i inhibira Raf-1 rezultirajući u padu aktivacije NF-κB-a (269).

1.6.1.1. Cink i upala

Dendritičke stanice (DC) igraju važnu ulogu u povezivanju urođenog i stečenog imunološkog odgovora. Čini ih heterogena populacija stanica koja ima različite funkcije u imunološkom sustavu, a razlikuju se prema različitim površinskim i unutarstaničnim biljezima (270). Oni prepoznaju okolišne agense i reagiraju na njih kao na patogene koje fagocitiraju i stimuliraju specifičan efektorski odgovor T-stanica. Nedavno je dokazana uloga DC-a u kontroli upale stvaranjem tolerancije. Ovaj podtip DC-a zove se tolerogeni DC i posreduje u kontroli upale te oblikuje regulacijski fenotip T-stanica (271). Cink (Zn) igra ključnu ulogu u homeostazi i optimalnom funkcioniranju urođenih i adaptivnih segmenata imuniteta (272) te djeluje kao intracelularna signalna molekula i regulira funkcije nekoliko mijeloidnih i limfoidnih populacija stanica (273). Stoga njegov manjak može utjecati na razvoj i funkciju T-stanica, B-stanica, NK-stanica te monocita i makrofaga. Nedostatak cinka inhibira litičku aktivnost NK-stanica i proizvodnju Th1 citokina te adekvatnog odgovora B-stanica (273), a s druge strane, nadoknadom cinka može se regulirati imunosna reakcija tijekom infekcije ograničavanjem prekomjerne sinteze proupalnih citokina (274). Regulacija homeostaze cinka također utječe na sazrijevanje DC-a (275). Nakon aktivacije infektivnim agensom dolazi do sazrijevanja DC-a s vanjskom ekspresijom MHC klase II biljega (MHC-II), kako bi potom potaknuli proliferaciju i diferencijaciju T-stanica (276). Kao odgovor na TLR4 stimulaciju LPS-a, DC stanice smanjuju sadržaj intracelularnog cinka koji je ključan za eksprimiranje, tj. podizanje na površinu stanice MHC-II. Obrnuto, egzogenim dodavanjem cinka smanjuje se ekspresija MHC-II na površini DC stanica kroz endocitozu i smanjen vezikularni prijenos proteina (277). Zn nije

promijenio TLR4 površinsku ekspresiju na DC-ovima što dokazuje da metal inhibira mehanizme nizvodno od receptora do aktivacije NF-kB-a (278). Ti dokazi doprinose razumijevanju značenja cinka u kontroli upale, napose u uvjetima kao što je sepsa (279). Neobuzdana infekcija dovodi do hiperinflamacije. Na primjer, prolazni manjak plazmatske koncentracije cinka u sepsi pogoršava upalnu proizvodnju citokina i smrtnost, dok nadopuna cinka djelomično vraća zaštitu (280). Nedavna su istraživanja pokazala da cink mijenjanjem okoliša modulira proupalni odgovor i fenotip DC i utjecanjem na autokrine povratne mehanizme kontrole aktivacije DC-a. Dakle, dodavanje cinka može služiti kao potencijalna terapeutska mjera za ublažavanje proupalnih odgovora.

Cink inhibira aktivaciju STAT3 koja smanjuje Th17 diferencijaciju i potiče Treg inhibicijom Sirt-1 deacetilaze, enzima koji održava stabilnost Foxp3 (281-283). Dodavanjem cinka pojačava se aktivnost Treg-Th17 in vivo bez utjecaja na Th1 ili Th2 odgovore, što je posljedica izravnog djelovanja cinka na T-stanice ili neizravnog učinka kroz pojavljivanje tolerogenih DC-a. Usprkos izmijenjenoj ravnoteži između Treg i Th17, dodatak cinka neće umanjiti otpornost na infekcije, za što je zaslužan Th1 dominantni odgovor koji olakšava uklanjanje infekcije (284). Ukratko, podatci brojnih istraživanja otkrivaju da cink programira tolerogeni fenotip u DC-u, smanjuje površinsku ekspresiju MHC-II uz povećanje udjela MHC-IIlo DC-a i promoviranje tolerogenih markera u ovoj populaciji stanica. Dodavanjem cinka postignuta modulacija DC fenotipa u pravcu stvaranja tolerogenih subpopulacija stanica i pojačavanja aktivnosti Treg-Th17 može se pogodno koristiti u imunosupresiji i liječenju autoimunih bolesti. Tako manipuliranje fiziološkom homeostazom cinka može poslužiti kao atraktivna terapijska strategija za promjenu specifičnih funkcija imunoloških stanica u pravcu promicanja tolerancije ili suzbijanju imuna odgovora.

1.6.2. Magnezij

Sir Humphrey Davy otkrio je magnezij 1808. godine, a ime mu je dao po grčkome gradu Magnesia, gdje su otkrivene velike količine magnezijevog karbonata. Vrlo je rasprostranjen u prirodi. Najvažnije su uloge magnezija u organizmu sudjelovanje u mišićnoj kontrakciji, mineralizacija kostiju, prijenos živčanih impulsa, sudjelovanje u različitim enzimatskim sustavima, regulacija izlučivanja paratireoidnog hormona, čime utječe na metabolizam kalcija u tijelu, sinteza DNA-e i RNA-e te koagulacija krvi. U uskoj je povezanosti s kalcijem i kalijem. Uslijed nedostatka magnezija razvija se hipokalijemija, budući da je Na-K ATP-aza koja određuje prijenos kalija i natrija ovisna o magneziju te njegov nedostatak dovodi do

gubitka kalija u stanici i nakupljanja natrija, što se očituje poremećenom električnom aktivnošću, npr. srčanog mišića i aritmijama. Nedostatak se magnezija očituje i povećanom živčanom podražljivošću. Magnezij je, kao i drugi minerali, aktivator enzima od kojih se neki nalaze u kosti, npr. alkalna fosfataza i pirofosfataza (286).

Nedostatak magnezija ili poremećaj u njegovoj homeostazi, nastaje zbog neadekvatne prehrahrane unošenjem prerađene hrane u kojoj ga nema dovoljno, te zbog prisutnosti nekih bolesti probavnog sustava, kao i metaboličkih i endokrinih poremećaja. Pojačano se izlučivanje pojavljuje prilikom davanja dugotrajnih infuzija, u hiperkalcemiji, metaboličkoj acidozi i kroničnoj bubrežnoj bolesti, zbog osmotičke diureze prilikom glikozurije u dijabetesu. Endokrine su i metaboličke bolesti kod kojih je nedostatan magnezij: dijabetes, nedostatak fosfata, primarna hiperparatireoza, hipoparatireoza, primarni aldosteronizam i sindrom „gladnih kostiju". Preporučene doze variraju po dobi, zdravstvenom stanju organizma i njegovim posebnim potrebama pa je preporučena europska vrijednost 375 mg/dan (287).

Magnezij je ion važan u svim živim stanicama kao kofaktor mnogih enzima, posebno onih koji koriste visoke količine energije iz fosfatnih spojeva. Odnos inzulina i magnezija nedavno je istražen. Posebno je uočena uloga magnezija kao drugog glasnika u djelovanju inzulina, a s druge strane pokazalo se da je i sam inzulin važan čimbenik u regulaciji intracelularne akumulacije magnezija. Uvjeti povezani s inzulinskom rezistencijom, kao što su hipertenzija ili starenje, također su povezani s niskim intracelularnim sadržajem magnezija. Kad je riječ o šećernoj bolesti, smatra se da niske razine intracelularnog magnezija proizlaze iz urinom povećanih gubitaka i razvoja inzulinske rezistencije. Utjecaj takvog niskog intracelularnog sadržaja magnezija, koji pridonosi razvoju makro- i mikroangiopatije, tek treba utvrditi. Smanjeni intracelularni sadržaj magnezija može pridonijeti smanjenoj aktivnosti inzulina što se javlja u dijabetes melitusu tipa 2, no nije isključen utjecaj i u ŠBT1. Iz navedenog proizlazi da dugotrajno nadopunjavanje magnezija može pridonijeti poboljšanju inzulinskog djelovanja i općeg stanja bolesnika s dijabetesom melitusom (288).

1.6.2.1. Magnezij i upala

Nedavna su istraživanja pokazala da apliciranje MgS04 prije prijevremenog poroda ima neuroprotektivnu ulogu, smanjujući rizik od cerebralne paralize i većih motoričkih disfunkcija. Neonatalne razine brojnih upalnih citokina koreliraju s neurološkim ishodom, što omogućava procjenu učinka MgS04 na citokinsku produkciju. Tome u prilog govore i studije koje su po-

kazale smanjenu majčinsku produkciju TNF-a i IL-6 nakon in vivo MgSO4 tretmana. Kratkoročno izlaganje klinički učinkovitoj koncentraciji MgS04 in vitro u novorođenčadi znatno smanjuje monocitnu proizvodnju upalnih citokina TNF-a i IL-6 bez utjecaja na životnu sposobnost stanice ili funkciju fagocita. Ispitivanjem mehanizma smanjene proizvodnje citokina otkrili smo da je imunomodulacijski učinak bio posredovan magnezijem, a ne sulfatnim dijelom, i bio je reverzibilan. Ekspozicija MgS04 i smanjena proizvodnja citokina događa se nakon stimulacije s različitim TLR ligandima kao i kada je magnezij dodan nakon TLR stimulacije, što snažno upućuje na zaključak da magnezij djeluje i izravno unutarstanično. Navedeni rezultati ispitivanja utjecaja magnezija na upalu upućuju na novu paradigmu po kojoj je za urođenu imunoregulaciju bitan i magnezij, koji prema tome ima ključnu regulatornu ulogu koju ostvaruje inhibicijom aktivacije nuklearnog čimbenika NF-kB (289). Iz navedenog istraživanja proizlazi zaključak da razina magnezija u serumu može imati značajnu ulogu u upalnim procesima, napose u prirođenoj imunosti, a mogući manjak može poticati upalne aktivnosti.

2. HIPOTEZE

1. Vrijednosti serumskog HMGB1 u djece koja boluju od ŠBT1 više su u odnosu na vrijednosti serumskog HMGB1 u zdrave djece.
2. Vrijednosti serumskog cinka u djece koja boluju od ŠBT1 niže su u odnosu na vrijednosti serumskog cinka u zdrave djece.
3. Vrijednosti serumskog HMGB1 u odnosu su s vrijednostima serumskog cinka, vrijednostima upalnih biljega, vrijednostima autoprotutijela i prisutnosti alela HLA specifičnih za ŠBT1.
4. Vrijednosti serumskog cinka u odnosu su s vrijednostima ostalih biokemijskih parametara u djece koja boluju od ŠBT1.
5. Vrijednosti serumskog magnezija u djece koja boluju od ŠBT1 niže su u odnosu na vrijednosti serumskog magnezija u zdrave djece.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni je cilj istraživanja utvrditi postoje li razlike u vrijednostima serumskog HMGB1 i cinka između skupine djece oboljele od ŠBT1 i kontrolne skupine zdrave djece.

U tu se svrhu ispitivalo:

- postoji li razlika u vrijednostima serumskog HMGB1 i cinka među skupinama djece novooboljelih od ŠBT1, djece koja boluju od ŠBT1 duže od jedne godine i skupine zdrave djece
- kakav je odnos između vrijednosti cinka u serumu i ostalih biokemijskih parametara u skupine djece oboljele od ŠBT1
- kakav je odnos između vrijednosti HMGB1 i cinka i upalnih biljega (L, C-reaktivni protein)
- kakav je odnos između vrijednosti HMGB1 i cinka te razine autoprotutijela specifičnih za ŠBT1
- kakav je odnos između vrijednosti HMGB1 i prisutnosti alela HLA vezanih uz ŠBT1
- kakav je odnos između vrijednosti magnezija u serumu i vrijednosti serumskog cinka u skupinama djece novooboljele od ŠBT1, djece koja boluju od ŠBT1 duže od jedne godine i skupine zdrave djece
- postoji li razlika u vrijednostima serumskog magnezija među skupinama djece novooboljele od ŠBT1, djece koja boluju od ŠBT1 duže od jedne godine i skupine zdrave djece.

4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

4.1. Ustroj istraživanja

Ispitivanje je osmišljeno kao kohortna prospektivna istraživačka studija. Probir i uključivanje ispitanika trajalo je u razdoblju od siječnja 2012. g. do srpnja 2013. g., a provedeno je u pedijatrijskoj endokrinološkoj ambulanti i Odjelu za endokrinologiju Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Osijek. Uzorci za biokemijsku analizu izrađeni su u Odjelu za medicinsku biokemiju KBC-a Osijek, Odjelu za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja KBC-a Osijek, u Zavodu za transfuzijsku medicinu KBC-a Osijek, Odjelu za medicinsku biokemiju KB-a Merkur u Zagrebu i u laboratoriju Medicinskog fakulteta u Osijeku. Prije bilo koje procedure vezane uz ispitivanje ispitanicima su dane detaljne informacije o planiranom ispitivanju, upoznati su sa sadržajem Informiranog pristanka, te su uz prethodni pismeni pristanak roditelja ili staratelja zakazani datum i vrijeme pregleda uz odgovarajuću prethodnu pripremu.

Nakon probira i provjere uključnih i isključnih kriterija u ispitivanje je uključen ukupno 141 ispitanik oba spola i to 101 bolesnik s tipom 1 šećerne bolesti, dok je kontrolnu skupinu činilo 40 ispitanika koji ne boluju od šećerne bolesti tipa 1 i drugih autoimunih i upalnih bolesti.

4.2. Ispitanici

Uključni su kriteriji za ispitanike:

- djeca oba spola s novootkrivenom šećernom bolesti tipa 1
- djeca koja se liječe duže vrijeme u našoj ustanovi od šećerne bolesti tipa 1, a ne boluju od drugih pridruženih autoimunih ili endokrinih bolesti, kao ni akutnih ili kroničnih upalnih bolesti
- životna dob ispitanika do 18 g.

Isključni su kriteriji za ispitanike:

- tip 2 šećerne bolesti i drugi podtipovi šećerne bolesti koji nisu autoimune etiologije
- pozitivna anamneza u pravcu akutne infekcije ili drugih interkurentnih bolesti povezanih s prisutnošću akutne ili kronične upale
- druge endokrine bolesti autoimune etiologije
- dugotrajna primjena lijekova s imunomodulatornim ili antiinflamatornim učinkom u razdoblju koje je prethodilo razvitku bolesti (kortikosteroidi, imunosupresivi)
- dijagnoza maligne bolesti.

Uključni su kriteriji za kontrolnu skupinu:

- djeca oba spola koje ne boluju od šećerne bolesti tipa 1 niti drugih podtipova dijabetesa
- djeca oba spola koja ne boluju od endokrinih ili drugih autoimunih ili akutnih i kroničnih upalnih bolesti
- životna dob ispitanika do 18 g.

Isključni su kriteriji za kontrolnu skupinu:

- anamnestički podatci o korištenju imunomodulirajućih lijekova (kortikosteroidi, imunosupresivi)
- anamnestički podatak o akutnoj ili kroničnoj infekciji
- dijagnoza maligne bolesti.

4.3. Metode

4.3.1. Protokol ispitivanja

Istraživanje su odobrila Etička povjerenstva Kliničkoga bolničkog centra Osijek i Medicinskoga fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku. Tijekom istraživanja poštovana su sva etička načela postavljena i proklamirana u relevantnim međunarodnim, europskim i nacionalnim smjernicama.

Tijekom planirane posjete ili prilikom hospitalizacije ispitanika, nakon što su upoznati sa sadržajem Informiranog pristanka te nakon što su roditelji ili skrbnik dali pismeni pristanak za sudjelovanje u ispitivanju, u svih su ispitanika prikupljeni svi relevantni anamnestički podatci koji su uključivali obiteljsku anamnezu, dijagnozu bolesti, nazočnost čimbenika rizika za razvitak tipa 1 šećerne bolesti, podatke o razvitku kroničnih komplikacija, pratećim bolestima i popratnoj medikaciji. Učinjen je pažljivi fizikalni pregled ispitanika uz standardizirano mjerenje tjelesne težine, visine, opsega struka i krvnog tlaka. Također je učinjeno uzorkovanje krvi i urina za biokemijske analize (GUK, HbA1c, HMGB1, transaminaze, lipidogram, urea, kreatinin, urat, KKS, ukupni proteini, albumini, CRP, Zn, Mg, Fe, ferogram), za procjenu razvitka komplikacija (24h proteinurija, 24h albuminurija), za HLA tipizaciju, kao i za analizu endokrinoloških pretraga (inzulin, c-peptid, TSH, FT3, FT4, antiTPO, ATINS) te analiza protutijela na beta stanične komponente gušterače (ICA, GAD, IA-2).

4.3.2. Anamneza i pregled medicinske dokumentacije

Podatci koji su prikupljeni uzimanjem anamnestičkih podataka i pregledom medicinske dokumentacije prikazani su u tablici 4.1.

Tablica 4.1. Podatci prikupljeni anamnezom i pregledom medicinske dokumentacije

Podatak	**Opis podatka**
Osnovna obilježja ispitanika	
dob	godine
spol	muško/žensko
Komorbiditeti	
autimune bolesti	DA/NE
druge upalne bolesti	**DA/NE**
Dijagnoza i terapija šećerne bolesti	
dob ispitanika pri postavljanju dijagnoze	**godine**
inzulinska terapija	**generički naziv lijeka**
Razvoj kroničnih komplikacija	
dijabetička retinopatija	DA/NE
dijabetička polineuropatija	DA/NE
dijabetička nefropatija	DA/NE

4.3.3. Klinički i antropometrijski podatci

Tjelesna masa mjerena je tijekom ispitivanja na istoj standardiziranoj vagi do najbližih 0,1 kg, u donjem rublju, bez cipela, nakon što je ispitanik bio natašte kroz razdoblje od minimalno 10 sati.

Tjelesna visina mjerena je na standardiziranom visinomjeru u ispitanika bez obuće do najbližih 0,5 cm.

Indeks tjelesne mase (ITM) izračunao se kao omjer tjelesne težine izražene u kilogramima i kvadrata tjelesne visine izražene u metrima (ITM = tjelesna težina u kg / kvadrat tjelesne visine u m).

Krvni tlak mjeren je na standardiziranom tlakomjeru u svih ispitanika nakon što su prethodno u sjedećoj poziciji proveli minimalno 5 minuta, koristeći pritom nedominantnu ruku. Za mjerenje opsega struka koristio se plastični centimetar. Prema preporukama SZO-a mjerenje je vršeno u stojećem stavu, u donjem rublju.

Pregled oftalmologa – svi dijabetički bolesnici koji unatrag 6 mjeseci nisu bili oftalmološki pregledani, pregled su učinili tijekom ispitivanja u cilju evaluacije razvitka kroničnih dijabetičkih komplikacija na očima: dijabetičke retinopatije (neproliferativne ili proliferativne).

Pregled psihologa – svi novootkriveni dijabetički bolesnici inicijalno prolaze psihološko testiranje radi procjene psihosocijalnih sposobnosti koje su bitne radi procjene svladavanja vještina bitnih u samokontroli i liječenju inzulin-ovisne šećerne bolesti.

4.3.4. Biološke analize

Plazma i serum svih ispitanika pripremljeni su iz uzoraka krvi dobivenih venepunkcijom ujutro natašte i analizirani na L, GUP, HbA1c, HMGB1, Zn, Mg, CRP, ukupne proteine, albumine, AST, ALT, yGT, ureu, kreatinin, kolesterol, HDL, LDL, trigliceride, 24h albuminuriju, 24h proteinuriju te određeni metodama navedenim u Tablici 4.2.

Tablica 4.2. Opis biokemijskih analiza

PRETRAGE	METODE	INSTRUMENT
Leukociti	Elektronski brojač (citometrija)	Sysmex XN 2000
Eritrociti	Elektronski brojač (citometrija)	Sysmex XN 2000
Hemoglobin	Elektronski brojač (spektrofotometrija)	Sysmex XN 2000
Feritin	Imunoturbidimetrijska metoda s lateks česticama	Beckman Coulter AU 680
AST	Fotometrijska UV metoda, IFCC metoda, 37 ºC, TRIS pufer, L-aspartat, α-ketoglutarat, piridoksal-fosfat, NADH, malat-dehidrogenaza, laktat-dehidrogenaza, pH 7,65	Beckman Coulter AU 680
ALT	Fotometrijska UV metoda, IFCC metoda, 37ºC, TRIS pufer, L-alanin, α-ketoglutarat, piridoksal-fosfat, NADH, laktat- dehidrogenaza, pH 7,15	Beckman Coulter AU 680
γ-GT	Fotometrijska kontinuirana metoda, IFCC metoda, 37 ºC, L-γ-glutamilkarboksi-p-nitroanilid uz glicilglicin, pH 7,7	Beckman Coulter AU 680
CRP	Imunoturbidimetrijska metoda s lateks česticama	Beckman Coulter AU 680
kolesterol	Fotometrijska metoda s kolesterol-oksidazom (CHOD-PAP)	Beckman Coulter AU 680
HDL	Homogena enzimimunoinhibicijska metoda	Beckman Coulter AU 680
LDL	Fotometrijska metoda s zaštitnim reagensom	Beckman Coulter AU 680
trigliceridi	Fotometrijska metoda s glicerofosfat-oksidazom (GPO-PAP)	Beckman Coulter AU 680

HMGB1	„Sandwich—ELISA (IBL Gesellschaft für Immunochemie und Immunobioligie MBH)	Ručno
HbA1c	Imunoinhibicijska metoda	DimensionExL, Siemens Diagnostics
glukoza	Fotometrijska UV metoda s heksokinazom	Beckman Coulter AU 680
urea	Fotometrijska UV metoda s ureazom i glutamat dehidrogenazom (ureaza GLDH)	Beckman Coulter AU 680
kreatinin	Fotometrijska metoda s kreatininazom	Beckman Coulter AU 680
24h proteinurija	Fotometrijska metoda s pirogalolom	Beckman Coulter AU 680
24h aluminurija	Imunoturbidimetrijska metoda	Beckman Coulter AU 680
ukupni proteini	Fotometrijska metoda s biuret reagensom	Beckman Coulter AU 680
albumini	Fotometrijska metoda s bromkrezol-zelenilom	Beckman Coulter AU 680
Zn	Fotometrijska metoda s 5-Br-PAPS reagensom	Beckman Coulter AU 680
Mg	Fotometrijska metoda s ksilidil plavilom	Beckman Coulter AU 680
Fe	Fotometrijska metoda s TPTZ reagensom	Beckman Coulter AU 680

U endokrinološkom laboratoriju Kliničkog odjela za radiofarmake i radioimunologiju Kliničkog zavoda za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja pri Kliničkom bolničkom centru Osijek analizirani su svi uzorci za hormonske pretrage. Uzorci su centrifugirani te zamrznuti na -20 °C, potom obrađeni u jednom postupku prema metodama i uputama proizvođača. Prosječno razdoblje od uzorkovanja do obrade uzoraka iznosilo je 6 mjeseci. Dijagnostički kompleti, proizvođači, referentne vrijednosti i koeficijenti varijabilnosti unutar (UKV) te između mjerenja (IKV) bili su kako slijedi u Tablici 4.3.

Tablica 4.3. Opis endokrinoloških analiza

	Metoda	Instrument	ProizvoĐač	Referentne vrijednosti
INZULIN	imFunoradiometrija (RIA)	Wallac Wizard 1470 Gamma counter	DIAsource ImmunoAssay S.A.	4 − 16 uIU/ml
C-PEPTID	imunoradiometrija (RIA)	Wallac Wizard 1470 Gamma counter	DIAsource ImmunoAssay S.A.	590 − 1560 pmol/L
TSH	imunoradiometrija (RIA)	Wallac Wizard 1470 Gamma counter	DIAsource ImmunoAssay S.A.	0,3 − 5,6 mU/L
FT3	imunoradiometrija (RIA)	Wallac Wizard 1470 Gamma counter	IASON, GmBH.	2,5 – 6,2 pmol/L
FT4	imunoradiometrija (RIA)	Wallac Wizard 1470 Gamma counter	IASON, GmBH.	11 − 23 pmol/L
Anti-TPO	imunoradiometrija (RIA)	Wallac Wizard 1470 Gamma counter	IASON, GmBH.	< 40 U/ml negativno, 40 – 60 U/ml granično, > 60 U/ml pozitivno

U Kliničkom zavodu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur u Zagrebu, koji je međunarodno certificiran i akreditiran za izradu standarda u imunolologiji, analizirani su uzorci prethodno centrifugirana seruma na protutijela na beta stanične komponente gušterače. Referentni intervali iskazani su prema harmonizaciji laboratorijskih nalaza iz opće i visokodiferentne medicinske biokemije (HKMB 2007) prema DASP programu. Dijagnostičke metode i referentni intervali navedeni su kako slijedi u Tablici 4.4.

Tablica 4.4. Opis imunoloških analiza

	Metoda	**Referentni interval**
IA-2 autoantitijela	Enzim imunokemija EIA	< 10 IU/ml negativno, > 10 IU/ml pozitivno
GAD autoantitijela	Enzim imunokemija EIA	< 5 IU/ml negativno, >5 IU/ml pozitivno
ICA autoantitijela	Indirektna imunofluorescencija IIF	< 0,5 negativno, 0,5 − 1 granično pozitivno, < 1 pozitivno

Prisutnost HLA rizičnih genotipova nije dokaz prisutnosti bolesti, no predstavlja dio genetskog rizika za obolijevanje od navedene bolesti. HLA tipizacija rađena je u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek prema sljedećoj metodi: PCR-SSO setovima Lifecodes HLA-A-SSO Typing Kit, Lifecodes HLA-B-SSO Typing Kit, Lifecodes HLA-DRB1-SSO Typing Kit i Lifecodes HLA-DQA1/B1-SSO Typing Kit. Prisutnost rizičnih haplotipova kao što su HLA-DRB1-04, DQA1-03, DQB1-03 ukazuje na sklonost razvoju šećerne bolesti tipa 1 (Roark CL i sur. Diabetes 2014:63:323:31; Noble JA i sur. CHS Perspect Med 2012:2:a007732).

4.3.5. Statistička obrada podataka

Kategorijski su podatci predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci opisani su medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike kategorijskih varijabli testirane su $\chi 2$ testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlike numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Mann-Whitneyjevim U-testom. Razlike numeričkih varijabli između triju i više nezavisnih skupina testirane su zbog odstupanja od normalne raspodjele Kruskal-Wallisovim testom. Povezanost numeričkih varijabli ocijenjena je, zbog odstupanja od normalne raspodjele, Spearmanovim koeficijentom korelacije **ρ** (rho). Sve su P-vrijednosti dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na Alpha = 0,05.
Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc Statistical Software, inačica 18.2.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; http://www.medcalc.org; 2018)

4.3.6. Osobine ispitanika

U istraživanje je uključen ukupno 141 ispitanik, od toga 101 ispitanik s dokazanom šećernom bolesti tipa 1 i 40 kontrolnih ispitanika. U kontrolnih ispitanika šećerna je bolest tipa 1 isključena temeljem vrijednosti glukoze u plazmi natašte nižom od 7,0 mmol/L, te vrijednosti glikoziliranog hemoglobina HbA1c nižom od 6,5 %. Ispitanici obiju skupina nisu imali pridružene upalne i autoimune bolesti kao ni prekomjernu tjelesnu težinu temeljem izračunate vrijednosti indeksa tjelesne mase ITM manjeg od 25 kg/m². Prema dobi i spolu između bolesnika i kontrolne skupine nije bilo statistički značajne razlike. Kada su uspoređivane dob bolesnika pri dijagnozi dijabetesa tipa 1 i dob kontrolne skupine, rezultati su pokazali da su bolesnici u trenutku dijagnoze bili nešto mlađi, no bez bitne razlike u odnosu na trenutačnu dob kontrolne skupine. Tjelesna težina, indeks tjelesne mase (ITM), kao i opseg struka bili su nešto viši u kontrolnoj skupini. Za uvid u metabolizam ugljikohidrata, odnosno glukoze odabrano je nekoliko pokazatelja: glukoza u plazmi natašte, glikolizirani hemoglobin (HbA1c), inzulin i C-peptid. Analiza vrijednosti glukoze u plazmi natašte i Hba1c-a bile su očekivano značajno više u dijabetičkih bolesnika, jasno demostrirajući osnovni patofiziološki poremećaj oslabljene funkcije β-stanica gušterače u dijabetičkih ispitanika. U cilju istraživanja upalne aktivnosti u objema skupinama ispitanika učinjena je analiza niza upalnih pokazatelja u cilju potvrde tvrdnje da dijabetičke bolesnike karakterizira stanje kronične upale niskog stupnja aktivnosti. Rezultati su pokazali da je skupina bolesnika s tipom 1 šećerne bolesti imala značajno više vrijednosti HbA1c-a u odnosu na kontrolnu skupinu, no bez statistički značajne razlike u vrijednostima leukocita i CRP-a.

5. REZULTATI

5.1. Opća i klinička obilježja ispitanika

U istraživanju je sudjelovao 141 ispitanik, od kojih je 101 (71,6 %) ispitanik koji boluje od šećerne bolesti tipa 1 (ŠBT1) i 40 (28,4 %) ispitanika koji čine kontrolnu skupinu, a to su djeca upućena radi obrade, a ne boluju od dijabetesa, autoimunih ili akutnih infektivnih bolesti. Središnja je dob (medijan) ispitanika 14 godina (interkvartilnog raspona 12 − 17 godina) bez značajne razlike u dobi prema skupinama (Tablica 5.1).

Tablica 5.1. Ispitanici prema dobi i skupinama

	Medijan (interkvartilni raspon)			
	Kontrolna skupina	Eksperimentalna skupina (ŠBT1)	Ukupno	*P**
Dob ispitanika	14 (11 – 17)	15,5 (13 – 17)	14 (12 – 17)	0,09

*Mann-Whitneyjev U-test

Djevojčica je 76 (53,9 %), a dječaka 65 (46,1 %), bez značajnih razlika prema skupinama (Tablica 5.2).

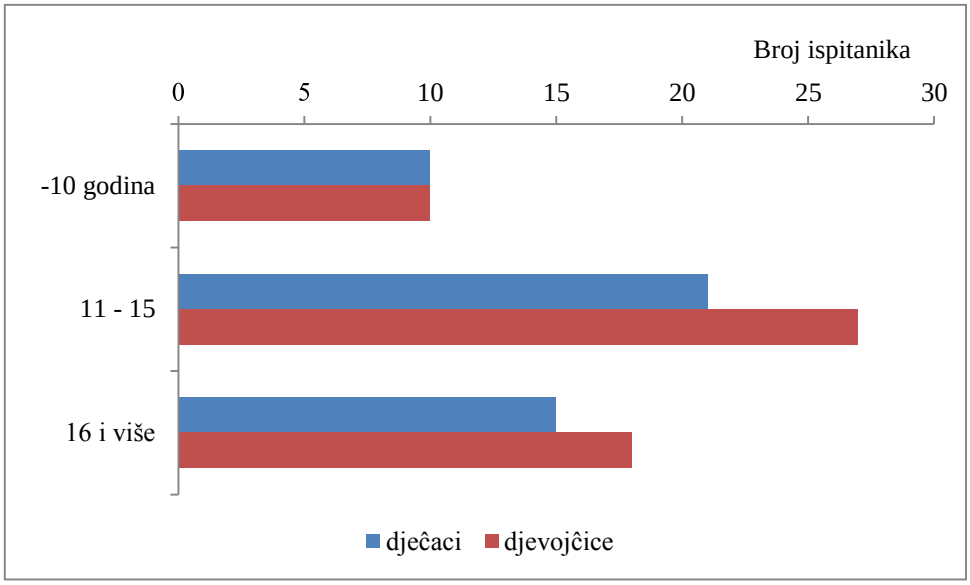
Tablica 5.2. Raspodjela ispitanika prema spolu i skupinama

	Broj (%) ispitanika			
	Kontrolna skupina	Eksperimentalna skupina (ŠBT1)	Ukupno	*P**
Dječaci	19 (47,5)	46 (45,5)	65 (46,1)	0,85
Djevojčice	21 (52,5)	55 (54,5)	76 (53,9)	
Ukupno	40 (100)	101 (100)	141 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Ispitanike eksperimentalne skupine podijelili smo prema dobi na tri skupine: do 10 godina, od 11 do 15 godina i starije od 15 godina.

U sve tri dobne skupine podjednak je udio prema spolu (Slika 5.1)



Slika 5.1. Raspodjela ispitanika eksperimentalne skupine prema dobi i spolu

Srednja je dob ispitanika eksperimentalne skupine (ŠBT1) u kojoj su se razboljeli 8 godina (interkvartilnog raspona 6 – 12 godina), u rasponu od 2 do 17 godina.

Kod ispitanika do 10 godina starosti srednja je dob pojavnosti bolesti 5 godina, uz interkvartilni raspon od 3 do 6,7 godina, značajno manje nego kod ispitanika starijih dobnih skupina (Kruskal-Wallisov test, $P < 0{,}001$).

Novootkrivenih je dijabetičara (trajanje bolesti do 2 godine) 28 (19,9 %), a kroničara 73 (72,3 %). Srednja je dob novootkrivenih dijabetičara 11 godina (interkvartilnog raspona 8,3 − 14 godina), a srednja dob kroničnih dijabetičara 15 godina (interkvartilnog raspona 13 − 17 godina).

Srednja je visina ispitanika 157 cm (interkvartilnog raspona 139,3 − 169,3 cm), a srednja težina 46 kg (interkvartilnog raspona 31,3 − 58,5 kg).

S obzirom na srednju visinu i težinu ispitanika, srednji indeks tjelesne mase (ITM) iznosi 18,4 kg/m^3 (interkvartilnog raspona 16,4 kg/m^3 − 21,4 kg/m^3).

Značajno najviši indeks tjelesne mase kod ispitanika je starijih od 15 godina (Kruskal-Wallis test, $P < 0{,}001$) (Tablica 5.3).

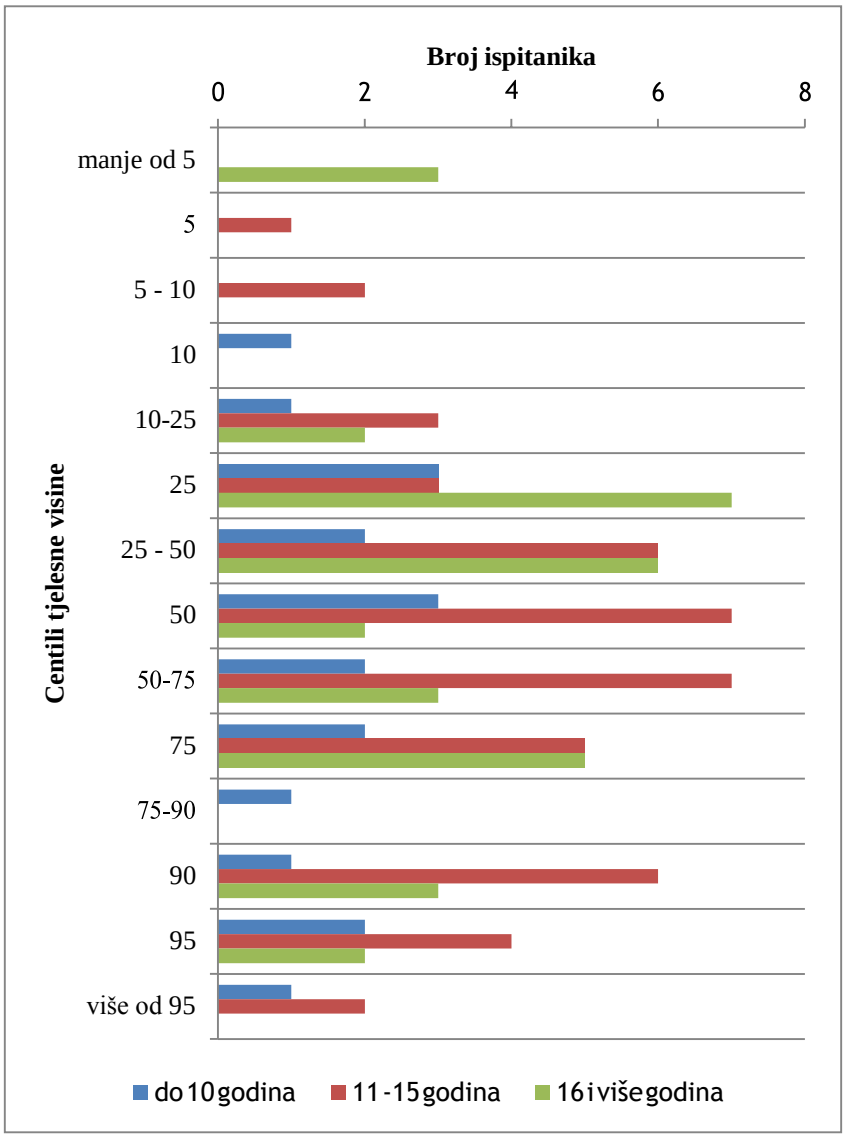
Tablica 5.3. Srednje vrijednosti varijabli prema dobnim skupinama

	Medijan (interkvartilni raspon) prema dobnim skupinama			p*
	≤ 10 (n = 20)	11 – 15 (n = 48)	≥ 16 (n = 33)	
Dob kod prve pojave bolesti (godine)	5 (3 – 6,7)	9 (6,8 – 10,3)	12 (7,5 – 14)	< **0,001**
Tjelesna visina (cm)	119 (115 – 133)	152,8 (140,5 – 162,8)	168,5 (160,3 – 174,2)	< **0,001**
Tjelesna težina (kg)	22 (19,7 – 27,7)	40,5 (34,5 – 52,6)	63,5 (53,5 – 72,9)	< **0,001**
Indeks tjelesne mase (ITM) (kg/m^3)	16,4 (13,7 – 17,3)	17,8 (16,1 – 19)	22,7 (20,2 – 25,2)	< **0,001**

*Kruskal-Wallisov test

Prema podjeli ispitanika prema centilima tjelesne visine najviše ih je od 25 do 75 centila, bez značajne razlike prema dobnim skupinama (Fisherov egzkatni test, P = 0,42). Manje od 5 centila tjelesne visine ima 3 (9,1 %) ispitanika u dobi od 16 i više godina.

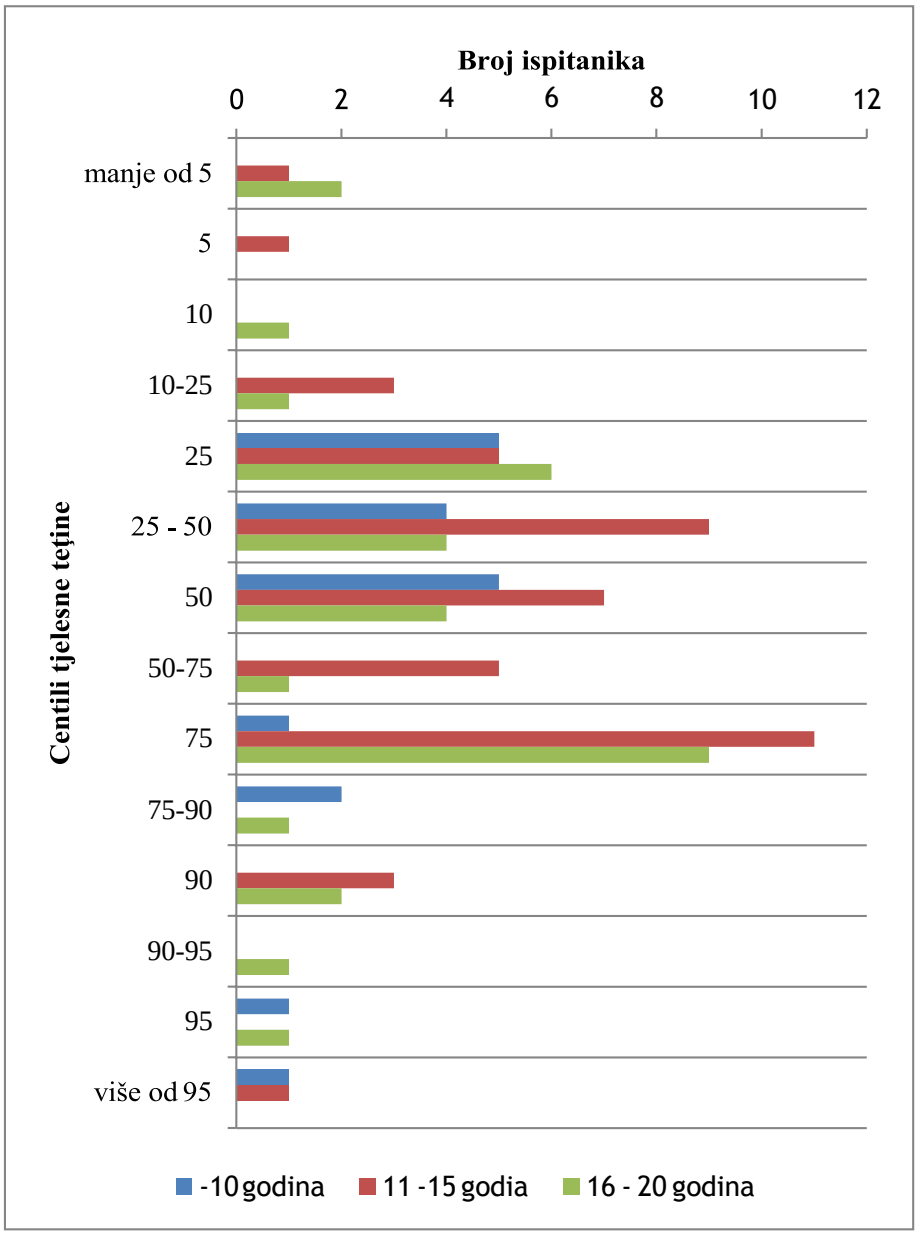
95 i više od 95 centila tjelesne visine ima 11 (11,3 %) ispitanika, od kojih je 3 (15,8 %) u dobi do 10 godina, njih 6 (13 %) u dobi 11 – 15 godina, a 2 (6,1 %) ispitanika starija su od 15 godina (Slika 5.2).



Slika 5.2. Ispitanici prema centilima tjelesne visine prema dobi

Najviše je ispitanika prema centilima tjelesne težine sa 75 centila, njih 21 (21,4 %, od kojih je 1 (5,3 %) u dobi do 10 godina, njih 11 (23,9 %) u dobi 11 – 15 godina, a 9 (27,3 %) su stariji od 15 godina.

S 95 i više od 95 centila tjelesne težine je 4 (4 %) ispitanika, od kojih je jedan u dobi do 10 godina, a po jedan u ostalim dobnim skupinama. Nema statistički značajne razlike u podjeli prema centilima tjelesne težine (Fisherov egzaktni test, P = 0,32) (Slika 5.3).



Slika 5.3. Ispitanici prema centilima tjelesne težine prema dobi

Prema indeksu tjelesne mase najveći broj ispitanika, njih 72 (73,5 %), normalno je uhranjeno (5 – 85 centila); pothranjeno (manje od 5 centila) je 18 (18,4 %) ispitanika, nešto više u dobnoj skupini 11 – 15 godina; prekomjernu tjelesnu težinu (85 – 95 centila) ima 7 (7,1 %) ispitanika, a samo je jedan ispitanik, stariji od 15 godina, pretio (95 i više centila). Nema značajne razlike u indeksu tjelesne mase prema dobnim skupinama (Tablica 5.4).

Tablica 5.4. Ispitanici prema indeksu tjelesne mase i dobnim skupinama

	Broj (%) ispitanika prema dobnim skupinama				*P**
	≤ 10	11 – 15	≥ 16	Ukupno	
Pothranjenost	4 (21,1)	10 (21,7)	4 (12,1)	18 (18,4)	0,05
Normalna uhranjenost	13 (68,4)	36 (78,3)	23 (69,7)	72 (73,5)	
Prekomjerna tjelesna težina	2 (10,5)	0	5 (15,2)	7 (7,1)	
Pretilost	0	0	1 (3)	1 (1)	
Ukupno	19 (100)	46 (100)	33 (100)	98 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Prema obiteljskoj anamnezi ispitanika skupine sa šećernom bolesti tipa 1 njih 57 (56,4 %) u obitelji ima drugih autoimunih bolesti ili nekih drugih bolesti: hipertenzija je zastupljena kod 19 (18,8 %) ispitanika; infarkt ili neki od oblika alergija kod 16 (15,8 %) ispitanika; karcinomi kod 28 (27,7 %) ispitanika te bolest štitnjače kod 3 (3 %) ispitanika.

Ostale bolesti, kao što su epilepsija, celijakija, reumatoidni artritis i glaukom u obiteljskoj su anamnezi zastupljeni u manjem broju.

Kod naših ispitanika, osim šećerne bolesti tipa 1, od bronhitisa i rinitisa boluje 3 (3 %) ispitanika, 2 (2 %) ispitanika imaju epilepsiju i mentalnu retardaciju, hidrocefalus i celijakiju te po jedan ispitanik ima proteniuriju, vezikoureteralni refluks, retenciju testitsa, cistične dojke, Down sindrom te uroĐenu srčanu grešku (Tetralogia Fallot).

Šećerna se bolest u obiteljskoj anamnezi pojavljuje kod 47 (46,5 %) ispitanika, od kojih 14 (13,9 %) imaju šećernu bolest tipa 1, a 33 (32,7 %) ispitanika šećernu bolest tipa 2.

Najčešće su to bake i djedovi, njih 25 (54,3 %); članovi uže obitelji (majka, otac, sestra ili brat) kod 11 (23,9 %) ispitanika; stričevi i ostala rodbina kod 10 (21,8 %) ispitanika.

5.2. Razlike u biokemijskim vrijednostima između skupina

Upalni parametri

Od upalnih parametara ispitanicima su se određivale vrijednosti leukocita i CRP-a (C-reaktivnog proteina).

U kontrolnoj skupini značajno je veći broj leukocita, 7,2 (interkvartilnog raspona 5,95 − 8,2) (Mann-Whitneyjev U-test, P = 0,02), dok su vrijednosti CRP-a tamo nešto niže, no bez značajne razlike prema eksperimentalnoj skupini (Tablica 5.5).

Tablica 5.5. Upalni parametri prema skupinama

	Medijan (interkvartilni raspon)			p*
	Kontrolna skupina	Eksperimentalna skupina (ŠBT1)	Ukupno	
Leukociti [• 10^9/L]	7,2 (5,95 − 8,2)	6 (5,17 − 7,8)	6,5 (5,4 − 8)	**0,02**
C-reaktivni protein	0,7 (0,2 – 1,28)	0,9 (0,5 – 1,45)	0,8 (0,4 – 1,4)	0,107

*Mann-Whitneyjev U-test

Iako postoje značajne razlike u broju leukocita prema skupinama, uzimajući u obzir referentne intervale, koje za leukocite ovise o dobi (do 2 godine 6 – 16; od 3 do 7 godina 5 – 13; od 8 do 19 godina 4,4 – 11,6), najviše ispitanika, njih 120 (86,3 %), ima broj leukocita u referentnom intervalu.

Za CRP (C-reaktivni protein) referentne su vrijednosti do 2,8. Vrijednosti C-reaktivnog proteina za 127 (92,7%) ispitanika u referentnom su intervalu podjednako u obje skupine (Tablica 5.6).

Tablica 5.6. Raspodjela ispitanika prema referentnim intervalima upalnih parametara

	Broj (%) ispitanika			
	Kontrolna skupina	Eksperimentalna skupina (ŠBT1)	Ukupno	*P**
Leukociti				
Manje od referentnog intervala	2 (5)	13 (13,1)	15 (10,8)	
Referentni interval	37 (92,5)	83 (83,8)	120 (86,3)	0,36
Više od referentnog intervala	1 (2,5)	3 (3)	4 (2,9)	
C-reaktivni protein				
Manje od referentnog intervala	3 (7,5)	7 (7,2)	10 (7,3)	> 0,99
Referentni interval	37 (92,5)	90 (92,8)	127 (92,7)	
Ukupno	40 (100)	101 (100)	141 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Crvena krvna slika i ferogram

Ispitanicima su izmjerene vrijednosti eritrocita, hemoglobina, željeza i feritina. Značajno je niža vrijednost hemoglobina u kontrolnoj skupini, 124,5 g/L (interkvartilnog raspona 119 – 133,5 g/L), u odnosu na 133 g/L (interkvartilnog raspona 126 – 141 g/L) eksperimentalne skupine.

Vrijednosti su feritina značajno više u eksperimentalnoj skupini i iznose 63,8 (interkvartilnog raspona 36,35 – 92,9) (Mann-Whitneyjev U-test, $p < 0,001$) (Tablica 5.7).

Tablica 5.7. Srednje vrijednosti crvene krvne slike i ferograma

	Medijan (interkvartilni raspon)			p*
	Kontrolna skupina	Eksperimentalna skupina (ŠBT1)	Ukupno	
Eritrociti [• 10^{12}/L]	4,5 (4,2175 − 4,8)	4,64 (4,42 − 4,99)	4,58 (4,37 − 4,96)	0,07
Hemoglobin [g/L]	124,5 (119 − 133,5)	133 (126 − 141)	132 (124 − 140)	< **0,001**
Željezo [μmol/L]	15,9 (10,55 − 20,525)	14,4 (9,7 − 18,05)	14,5 (9,95 − 18,95)	0,13
Feritin [L/L]	34,15 (22,075 − 57,1)	63,8 (36,35 − 92,9)	48,7 (30,85 − 82,75)	< **0,001**

*Mann-Whitneyjev U-test

Referentni je interval za vrijednosti hemoglobina 118 – 149 g/L. Značajna je razlika potvrđena samo u vrijednosti feritina (referentna vrijednost ovisi o spolu: muškarci 30 – 300; žene 10 – 120). Referentni interval broja eritrocita ovisi i o dobi i o spolu (do 7 godina 4 – 5; kod žena od 8 do 20 godina 4,07 – 5,42; kod muškaraca od 8 do 12 godina 4,34 – 5,47, a od 13 do 20 godina 4,43 – 5,88). Vrijednosti su željeza u serumu od 4 do 25 μmol/L za ispitanike do 7 godina; za muškarce od 8 do 20 godina referentni je interval 7 – 33 μmol/L, a za žene 6 – 31 μmol/L. Broj eritrocita manji od referentnog intervala ima 19 (13,7 %) ispitanika, od kojih je 9 (22,5 %) iz kontrolne skupine, a njih 10 (10,1 %) iz eksperimentalne skupine. Željezo je u referentnom intervalu kod 129 (92,8 %) ispitanika. Od ukupno 11 (7,8 %) ispitanika s nižom vrijednosti feritina značajno je veći broj ispitanika, njih 7 (17,5 %), iz kontrolne skupine. Četiri (4 %) ispitanika eksperimentalne skupine imaju vrijednosti više od referentnog intervala (Fisherov egzaktni test, $P = 0,01$) (Tablica 5.8).

Tablica 5.8. Raspodjela ispitanika prema referentnim intervalima hematoloških pretraga

	Broj (%) ispitanika			*P**
	Kontrolna skupina	Eksperimentalna skupina (ŠBT1)	Ukupno	
Eritrociti				
Manje od referentnog intervala	9 (22,5)	10 (10,1)	19 (13,7)	
Referentni interval	31 (77,5)	87 (87,9)	118 (84,9)	0,11
Više od referentnog intervala	0	2 (2)	2 (1,4)	
Hemoglobin				
Manje od referentnog intervala	6 (15)	6 (6,1)	12 (8,6)	
Referentni interval	33 (82,5)	80 (80,8)	113 (81,3)	0,05
Više od referentnog intervala	1 (2,5)	13 (13,1)	14 (10,1)	
Željezo				
Manje od referentnog intervala	2 (5)	6 (6,1)	8 (5,8)	
Referentni interval	37 (92,5)	92 (92,9)	129 (92,8)	0,78
Više od referentnog intervala	1 (2,5)	1 (1)	2 (1,4)	
Feritin				
Manje od referentnog intervala	7 (17,5)	4 (4)	11 (7,8)	
Referentni interval	33 (82,5)	93 (92,1)	126 (89,4)	**0,01**
Više od referentnog intervala	0	4 (4)	4 (2,8)	
Ukupno	40 (100)	101 (100)	141 (100)	

*Fisherov egzaktni test

U eksperimentalnoj skupini (ŠBT1) značajno su više vrijednosti glukoze u krvi, a značajno niži trigliceridi, čiji je medijan 0,94 mmol/L (interkvartilnog raspona 0,74 – 1,29 mmol/L), u odnosu na 2,83 mmol/L (interkvartilnog raspona 2,44 – 3,15 mmol/L) u kontrolnoj skupini (Mann-Whitneyjev U-test, $P < 0,001$) (Tablica 5.9).

Tablica 5.9. Srednje vrijednosti glukoze u serumu i triglicerida prema skupinama

	Medijan (interkvartilni raspon)			p*
	Kontrolna skupina	Eksperimentalna skupina (ŠBT1)	Ukupno	
Glukoza [mmol/ L]	5,15 (4,63 – 5,78)	13 (11 – 16)	12 (6 – 15)	**< 0,001**
Trigliceridi [mmol / L]	2,83 (2,44 – 3,15)	0,94 (0,74 – 1,29)	1,22 (0,8 – 2,45)	**< 0,001**

*Mann-Whitneyjev U-test

Referentni je interval glukoze 3,9 – 5,9 mmol/L, a triglicerida manje od 1,7 mmol/L. Glukozu veću od referentnog intervala imaju svi ispitanici eksperimentalne skupine, a trigliceride značajno više od referentne vrijednosti imaju ispitanici kontrolne skupine (Fisherov egzaktni test, $P < 0,001$) (Tablica 5.10).

Tablica 5.10. Raspodjela ispitanika prema referentnim intervalima hematoloških pretraga

	Broj (%) ispitanika			p*
	Kontrolna skupina	Eksperimentalna skupina (ŠBT1)	Ukupno	
Glukoza				
Referentni interval	31 (77,5)	0	31 (22,3)	**< 0,001**
Više od referentnog intervala	9 (22,5)	99 (100)	108 (77,7)	
Trigliceridi				
Referentni interval	1 (2,5)	86 (86,9)	87 (62,6)	**< 0,001**
Više od referentnog intervala	39 (97,5)	13 (13,1)	52 (37,4)	
Ukupno	40 (100)	99 (100)	139 (100)	

*Fisherov egzaktni test

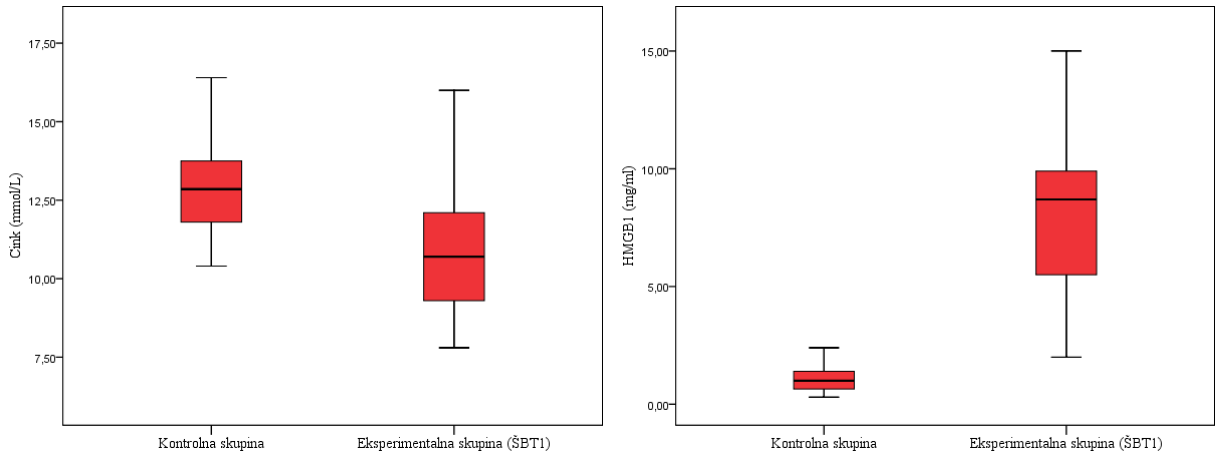
Vrijednosti cinka i proteina B1 visoko mobilne grupe (HMGB1) značajno se razlikuju prema skupinama.

Eksperimentalna skupina ima značajno nižu vrijednost cinka i značajno višu vrijednost HMBG1 (Mann-Whitneyjev U-test, $P < 0,001$) (Tablica 5.11 i Slika 5.4).

Tablica 5.11. Srednje vrijednosti cinka i HMBG1 prema skupinama

	Medijan (interkvartilni raspon)	95 % CI†	*P**
Cink [mmol/L]			
Kontrolna skupina	12,85 (11,8 – 13,8)	12,4 – 13,3	**< 0,001**
Eksperimentalna skupina	10,7 (9,3 – 12,1)	10,5 – 11,3	
HMGB1 [mg/ml]			
Kontrolna skupina	1 (0,625 – 1,45)	0,93 – 2,02	**< 0,001**
Eksperimentalna skupina	8,7 (5,5 – 9,95)	7,85 – 9,58	

*Mann-Whitneyjev U-test; †interval pouzdanosti



Slika 5.4. Srednje vrijednosti i interkvartilni raspon vrijednosti cinka i HMGB1

Referentni je interval cinka za dob do 5 godina 103 – 18,1 mmol/L; od 6 do 7 godina 11,8 − 16,4 mmol/L, a za dob od 8 do 18 godina 12,1 – 19,5 mmol/L.

Značajno veći broj ispitanika eksperimentalne skupine, njih 73 (73,7 %), ima vrijednost cinka ispod referentnog intervala (Fisherov egzaktni test, $P < 0,001$). Negativnim se nalazom

HMBG1 smatra svaki do 1,4 mg/ml. Svi ispitanici eksperimentalne skupine imaju vrijednosti iznad dozvoljene (Fisherov egzaktni test, $P < 0,001$) (Tablica 5.12).

Tablica 5.12. Raspodjela ispitanika prema referentnim intervalima cinka i HMGB1

	Broj (%) ispitanika			*P**
	Kontrolna skupina	Eksperimentalna skupina (ŠBT1)	Ukupno	
Cink				
Manje od referentnog intervala	13 (32,5)	73 (73,7)	86 (61,9)	**< 0,001**
Referentni interval	27 (67,5)	26 (26,3)	53 (38,1)	
Ukupno	40 (100)	99 (100)	139 (100)	
HMGB1				
Referentni interval	30 (75)	0	30 (21,3)	**< 0,001**
Više od referentnog intervala	10 (25)	101 (100)	111 (78,7)	
Ukupno	40 (100)	101 (100)	141 (100)	

*Fisherov egzaktni test

5.3. Vrijednosti biokemijskih parametara kod ispitanika eksperimentalne skupine

Nema značajne razlike u vrijednosti upalnih parametara prema dobi ispitanika (Tablica 5.13).

Tablica 5.13. Srednje vrijednosti upalnih parametara u eksperimentalnoj skupini po dobi

	Medijan (interkvartilni raspon) prema dobi				*P**
	≤ 10	11 − 15	≥ 16	Ukupno	
Leukociti [• 10^9/L]	7,95 (5,1 − 8,4)	5,65 (4,98 − 7,55)	6 (5,5 − 6,85)	6 (5,17 − 7,8)	0,08
C-reaktivni protein	0,7 (0,5 − 1,1)	0,8 (0,6 − 1,5)	0,9 (0,45 − 2)	0,9 (0,5 − 1,45)	0,35

*Mann-Whitneyjev U-test

Referentne vrijednosti upalnih parametara u eksperimentalnoj skupini: leukocita ima 83 (83,8 %) ispitanika, a C-reaktivnog proteina 90 (92,8 %), bez statistički značajne razlike prema dobi ispitanika eksperimentalne skupine (Tablica 5.14).

Tablica 5.14. Raspodjela ispitanika prema referentnim intervalima upalnih parametara

	Broj (%) ispitanika prema dobi				*P**
	≤ 10	11 - 15	≥ 16	Ukupno	
Leukociti					
Manje od referentnog intervala	3 (15)	7 (15,2)	3 (9,1)	13 (13,1)	0,66
Referentni interval	16 (80)	37 (80,4)	30 (90,9)	83 (83,8)	
Više od referentnog intervala	1 (5)	2 (4,3)	0	3 (3)	
C-reaktivni protein					
Referentni interval	18 (94,7)	42 (93,3)	30 (90,9)	90 (92,8)	0,86
Više od referentnog intervala	1 (5,3)	3 (6,7)	3 (9,1)	7 (7,2)	
Ukupno	20 (100)	48 (100)	34 (100)	101 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Ispitanicima eksperimentalne skupine značajne su promjene hemoglobina prema kriteriju dobi (Mann -Whitneyjev U-test, P = 0,008), ali su ipak sve u referentnom intervalu (Tablica 5.15).

Tablica 5.15. Crvena krvna slika i ferogram u eksperimentalnoj skupini

	Medijan (interkvartilni raspon) prema dobi				*P**
	≤ 10	11 − 15	≥ 16	Ukupno	
Eritrociti [• 10^{12}/L]	4,47 (4,25 − 4,81)	4,68 (4,47 − 4,96)	4,71 (4,33 − 5,13)	4,64 (4,42 − 4,99)	0,13
Hemoglobin [g/L]	126,5 (123,3 − 136,5)	134,5 (128,75 − 141)	135 (128,5 − 151)	133 (126 − 141)	**0,008**
Željezo [µmol/L]	11,45 (9,43 − 16,2)	14,6 (10,23 − 18,6)	14,5 (9,7 − 18,4)	14,4 (9,7 − 18,05)	0,45
Feritin [L/L]	59,4 (37,5 − 77)	66,2 (36,4 − 99,5)	56,4 (33,95 − 113,5)	63,8 (36,35 − 92,9)	0,73

*Mann-Whitneyjev U-test

Hemoglobin, čiji se referentni interval kreće od 118 do 149 g/L, ima 80 (80,8 %) ispitanika, značajno najviše onih do 10 godina starosti (Fisherov egzaktni test, *P* = 0,04) (Tablica 5.16).

Tablica 5.16. Raspodjela ispitanika prema referentnim intervalima (eritrociti, hemoglobin, željezo i feritin)

	Broj (%) ispitanika prema dobi				*P**
	≤ 10	11 − 15	≥ 16	Ukupno	
Eritrociti					
Manje od referentnog intervala	4 (20)	3 (6,5)	3 (9,1)	10 (10,1)	0,28
Referentni interval	15 (75)	43 (93,5)	29 (87,9)	87 (87,9)	
Više od referentnog intervala	1 (5)	0	1 (3)	2 (2)	
Hemoglobin					
Manje od referentnog intervala	2 (10)	2 (4,3)	2 (6,1)	6 (6,1)	**0,04**
Referentni interval	18 (90)	40 (87)	22 (66,7)	80 (80,8)	
Više od referentnog intervala	0	4 (8,7)	9 (27,3)	13 (13,1)	
Željezo					
Manje od referentnog intervala	0	2 (4,3)	4 (12,1)	6 (6,1)	0,31
Referentni interval	20 (100)	43 (93,5)	29 (87,9)	92 (92,9)	
Više od referentnog intervala	0	1 (2,2)	0	1 (1)	
Feritin					
Manje od referentnog intervala	0	3 (6,3)	1 (3)	4 (4)	0,52
Referentni interval	20 (100)	42 (87,5)	31 (93,9)	93 (92,1)	
Više od referentnog intervala	0	3 (6,3)	1 (3)	4 (4)	
Ukupno	20 (100)	48 (100)	34 (100)	101 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Iako su sve srednje vrijednosti aspartat aminotransferaza (AST) u referentnom intervalu (14 – 39 U/L), značajno najviše vrijednosti imaju ispitanici najmlađe dobne skupine (Mann-Whitneyjev U-test, p=0,001) (Tablica 5.17).

Tablica 5.17. Srednje vrijednosti enzima: aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT) prema dobi ispitanika

	Medijan (interkvartilni raspon) prema dobi				*P**
	≤ 10	11 − 15	≥ 16	Ukupno	
AST – aspartat aminotrasferaza [U/L]	24 (22,25 – 30,75)	22,5 (18 − 28)	20 (16 − 23)	22 (18 − 27)	**0,001**
ALT - alanin aminotransferaza [U/L]	17,5 (15 − 18,75)	19 (14,75 − 25)	19 (13,5 − 23)	18 (14 − 22)	0,502

*Mann-Whitneyjev U-test

Nema značajne razlike u raspodjeli ispitanika prema referentnim vrijednostima AST-a i ALT-a (Tablica 5.18).

Tablica 5.18. Ispitanici prema referentnim intervalima enzima AST-a i ALT-a

	Broj (%) ispitanika prema dobi				*P**
	≤ 10	11 − 15	≥ 16	Ukupno	
AST– aspartat aminotrasferaza					
Manje od referentnog intervala	0	1 (2,2)	4 (12,1)	5 (5,1)	
Referentni interval	20 (100)	44 (95,7)	29 (87,9)	93 (93,9)	0,17
Više od referentnog intervala	0	1 (2,2)	0	1 (1)	
ALT − alanin aminotransferaza					
Manje od referentnog intervala	0	2 (4,3)	3 (9,1)	5 (5,1)	
Referentni interval	20 (100)	42 (91,3)	28 (84,8)	90 (90,9)	0,46
Više od referentnog intervala	0	2 (4,3)	2 (6,1)	4 (4)	
Ukupno	20 (100)	46 (100)	33 (100)	99 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Značajno su najviše vrijednosti hormona FT4 (tiroksina) u ispitanika do 10 godina starosti, kad je srednja vrijednost 15,73 pmol/L (interkvartilnog raspona 13,7 – 18,83 pmol/L) (Mann-Whitneyjev U-test, $P = 0,02$). Iako je razlika po dobi značajna, sve su vrijednosti u referentnom intervalu (Tablica 5.19).

Tablica 5.19. Srednje vrijednosti hormona FT3, FT4 i TSH-a prema dobi

	Medijan (interkvartilni raspon) prema dobi				*P**
	≤ 10	11 − 15	≥ 16	Ukupno	
FT3 − trijodtironin [pmol/L]	3,73 (2,85 − 4,65)	4,09 (3,7 − 5)	3,57 (3,24 − 4,49)	4,02 (3,3 − 4,84)	0,88
FT4 − tiroksin [pmol/L]	15,73 (13,7 − 18,83)	14,37 (12,57 − 15,63)	13,67 (12,18 − 15,3)	14,47 (12,61 − 16,04)	**0,02**
TSH − tireotropin [mU/L]	1,69 (1,33 − 2,92)	2,09 (1,45 − 2,8)	1,84 (1,21 − 2,44)	2 (1,34 − 2,67)	0,71

*Mann-Whitneyjev U-test

Hormon FT3 manji od referentnog intervala (1,9 – 5,7 pmol/L) imaju samo dva ispitanika, a veće vrijednosti 8 (8,1 %) ispitanika, bez značajne razlike prema dobi.
Tiroksin (FT4) manji od referentnog intervala ima 10 (10,1 %) ispitanika, dok su svi ostali u referentnom intervalu (10 – 22 pmol/L)
Tireotropin (TSH) u referentnom intervalu (0,3 – 5,6 mU/L) ima 94 (94,9 %) ispitanika (Tablica 5.20).

Tablica 5.20. Ispitanici prema referentnim intervalima hormona FT3, FT4 i TSH-a prema dobi ispitanika

	Broj (%) ispitanika prema dobi				*P**
	≤ 10	11 − 15	≥ 16	Ukupno	
FT3 - trijodtironin					
Manje od referentnog intervala	1 (5)	1 (2,2)	0	2 (2)	0,49
Referentni interval	17 (85)	40 (87)	32 (97)	89 (89,9)	
Više od referentnog intervala	2 (10)	5 (10,9)	1 (3)	8 (8,1)	
FT4 - tiroksin					
Manje od referentnog intervala	2 (10)	6 (13)	2 (6,1)	10 (10,1)	0,60
Referentni interval	18 (90)	40 (87)	31 (93,9)	89 (89,9)	
TSH - tireotropin					
Manje od referentnog intervala	0	0	1 (3)	1 (1)	0,39
Referentni interval	19 (95)	43 (93,5)	32 (97)	94 (94,9)	
Više od referentnog intervala	1 (5)	3 (6,5)	0	4 (4)	
Ukupno	20 (100)	46 (100)	33 (100)	99 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Značajno najvišu srednju vrijednost kreatinina imaju ispitanici od 16 i više godina, a ona iznosi 57 μmol/L (interkvartilnog raspona 47 – 64,5 μmol/L) (Mann-Whitneyjev U-test, $P < 0{,}001$). Sve su vrijednosti u referentnom intervalu (27 – 81 μmol/L). Vrijednosti ureje i albumina također se kreću u referentnim intervalima. Proteini, s vrijednosti od 46,5 g/L (interkvartilnog raspona 31 – 87,75 g/L) značajno su najniži kod ispitanika do 10 godina (Mann-Whitneyjev U-test, $P = 0{,}04$) (Tablica 5.21).

Tablica 5.21. Srednje vrijednosti biokemijskih parametara

	Medijan (interkvartilni raspon) prema dobi				*P**
	≤ 10	11 − 15	≥ 16	Ukupno	
Urea [mmol/L]	4,95 (3,75 − 6,1)	5,3 (4,28 − 6,28)	4,8 (4,05 − 6)	5 (4,2 − 6,1)	0,83
Kreatinin [μmol/L]	31,5 (28,25 − 35,75)	43,5 (37,75 − 51,25)	57 (47 − 64,5)	45 (35 − 56)	**< 0,001**
Albumini [g/L]	6,95 (5 − 30,5)	5,7 (3,45 − 12,5)	8,8 (3,73 − 18,45)	6,8 (3,8 – 14,55)	0,93
Proteini [g/L]	46,5 (31 − 87,75)	75 (52 − 128,5)	89 (55 − 152,25)	75 (41 − 128)	**0,04**

*Mann-Whitneyjev U-test

S obzirom na referentni interval, od ukupno 92 (92,9 %) ispitanika s kreatininom u referentnom intervalu, značajno ih je manje, njih 17 (85 %), iz najmlađe dobne skupine (Fisherov egzaktni test, *P* = 0,04) (Tablica 5.22).

Tablica 5.22. Ispitanici prema referentnim intervalima ureje i kreatinina

	Broj (%) ispitanika prema dobi				*P**
	≤ 10	11 − 15	≥ 16	Ukupno	
Urea					
Referentni interval	19 (95)	43 (93,5)	30 (90,9)	92 (92,9)	0,84
Više od referentnog intervala	1 (5)	3 (6,5)	3 (9,1)	7 (7,1)	
Kreatinin					
Manje od referentnog intervala	3 (15)	0	1 (3)	4 (4)	**0,04**
Referentni interval	17 (85)	45 (97,8)	30 (90,9)	92 (92,9)	
Više od referentnog intervala	0	1 (2,2)	2 (6,1)	3 (3)	
Ukupno	20 (100)	46 (100)	33 (100)	99 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Vrijednosti albumina u urinu u referentnom intervalu ima 89 (91,8 %) ispitanika, a proteina u urinu 95 (97,9 %) ispitanika, podjednako prema dobnim skupinama.
Vrijednosti albumina više od referentnog intervala ima 8 (8,2 %) ispitanika, a 2 (2,1 %) ispitanika ima vrijednosti proteina u urinu više od referentnog intervala (Tablica 5.23).

Tablica 5.23. Ispitanici prema referentnim intervalima albumina i proteina u urinu

	Broj (%) ispitanika prema dobi				*P**
	≤ 10	11 – 15	≥ 16	Ukupno	
Albumini (urin)					
Referentni interval	17 (85)	41 (91,1)	31 (96,9)	89 (91,8)	
Više od referentnog intervala	3 (15)	4 (8,9)	1 (3,1)	8 (8,2)	
Proteini (urin)					
Referentni interval	20 (100)	45 (100)	24 (94)	95 (97,9)	0,08
Više od referentnog intervala	0	0	2 (6)	2 (2,1)	
Ukupno	20 (100)	45 (100)	32 (100)	97 (100)	

*Fisherov egzaktni test

U lipidogramu nema značajnih razlika prema dobnim skupinama: ukupni kolesterol je 4,4 mmol/L; srednja vrijednost HDL-a 2,57 mmol/L, što je više od preporučene vrijednosti koja je do 1,7 mmol/L; vrijednost LDL-a, koja je preporučena do 3 mmol/L, iznosi 1,37 mmol/L, podjednako u svim dobnim skupinama, te su trigliceridi, s preporučenom vrijednosti do 1,7 mmol/L, kod najmlađe skupine ispitanika nešto viši, a iznose 1,22 mmol/L (interkvartilnog raspona 0,83 – 1,75 mmol/L) (Tablica 5.24).

Tablica 5.24. Srednje vrijednosti i interkvartilni raspon lipidograma

Lipidogram	Medijan (interkvartilni raspon) prema dobi				*P**
	≤ 10	11 − 15	≥ 16	Ukupno	
Kolesterol [mmol/L]	4,11 (3,49 − 5,65)	4,5 (3,96 − 4,74)	4,39 (3,78 − 5,29)	4,4 (3,82 − 4,83)	0,52
HDL [mmol/L]	2,39 (2,03 − 2,83)	2,58 (2,36 − 2,86)	2,58 (2,24 − 3,41)	2,57 (2,25 − 2,95)	0,40
LDL [mmol/L]	1,39 (0,9 − 1,64)	1,36 (1,18 − 1,71)	1,39 (1,2 − 1,67)	1,37 (1,18 − 1,66)	0,39
Trigliceridi [mmol/L]	1,22 (0,83 − 1,75)	0,83 (0,7 − 1,09)	0,97 (0,77 − 1,35)	0,94 (0,74 − 1,29)	0,21

*Mann-Whitneyjev U-test

S obzirom na preporučene vrijednosti, jedino se vrijednosti triglicerida značajno razlikuju prema dobnim skupinama. Od 13 (13,1 %) ispitanika s vrijednostima triglicerida većim od preporučenih (do 1,7 mmol/L) značajno ih je više u najmlađoj dobnoj skupini, njih 6 (30 %) (Fisherov egzkatni test, P = 0,005) (Tablica 5.25).

Tablica 5.25. Ispitanici prema referentnim intervalima lipidograma

	Broj (%) ispitanika prema dobi				*P**
	≤ 10	11 − 15	≥ 16	Ukupno	
Kolesterol					
Referentni interval	13 (65)	34 (73,9)	22 (66,7)	69 (69,7)	0,69
Više od referentnog intervala	7 (35)	12 (26,1)	11 (33,3)	30 (30,3)	
Hdl					
Referentni interval	16 (80)	34 (73,9)	26 (78,8)	76 (76,8)	0,82
Više od referentnog intervala	4 (20)	12 (26,1)	7 (21,2)	23 (23,2)	
Ldl					
Referentni interval	16 (80)	37 (80,4)	22 (66,7)	75 (75,8)	0,33
Više od referentnog intervala	4 (20)	9 (19,6)	11 (33,3)	24 (24,2)	
Trigliceridi					
Referentni interval	14 (70)	45 (97,8)	27 (81,8)	86 (86,9)	**0,005**
Više od referentnog intervala	6 (30)	1 (2,2)	6 (18,2)	13 (13,1)	
Ukupno	20 (100)	46 (100)	33 (100)	99 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Ispitanici eksperimentalne skupine imaju vrijednosti glukoze puno više od referentnog intervala (3,9 – 5,9 mmol/L), a značajno su više kod ispitanika od 16 i više godina (Mann-Whitneyjev U-test, P = 0,002).

HbA1c mjera je količine šećera vezane uz hemoglobin u crvenim krvnim zrncima, pa je kao takav koristan pokazatelj cjelokupne kontrole šećera jer prikazuje kako je šećer u krvi nadziran tijekom protekla 3 mjeseca. Normalnim razinama HbA1c-a smatraju se one niže od 6 %. Eksperimentalna skupina ispitanika ima sve srednje vrijednosti iznad referentnog intervala, bez značajnih razlika prema dobi ispitanika. Vrijednosti su C-peptida (referentni interval 560 – 1560 mmol/L) bez značajnih razlika prema dobnim skupinama, ali su sve ispod referentnog intervala (Tablica 5.26).

Tablica 5.26. Srednje vrijednosti glukoze, Hba1c-a i C-peptida prema dobnim skupinama

	Medijan (interkvartilni raspon) prema dobi				*P**
	do 10 godina	11 – 15 godina	16 i više godina	Ukupno	
Glukoza [mmol/L]	12 (10,25 − 14)	13 (10,75 − 15)	16 (12,5 − 20,5)	13 (11 − 16)	**0,002**
Hba1c [mmol/L]	7,9 (7,33 − 9)	7,9 (7,58 – 8,73)	8,2 (7,4 − 8,7)	7,9 (7,4 − 8,8)	0,93
C-peptid [mmol/L]	197 (120,25 − 226,75)	200 (141,5 – 299,5)	151 (90,5 − 387,5)	192,5 (116,25 – 300)	0,74

*Mann-Whitneyjev U-test

Glukozu i HMGB1 imaju svi ispitanici veće od referentne vrijednosti, a kad je riječ o vrijednosti Hba1c-a, značajno više ispitanika s trajanjem bolesti više od dvije godine, njih 60 (84,5 %), ima vrijednosti veće od referentnih (Fisherov egzaktni test, P = 0,02) (Tablica 5.27).

Tablica 5.27. Raspodjela ispitanika prema referentnim intervalima Hba1c-a i C-peptida prema dobnim skupinama u eksperimentalnoj skupini

	Broj (%) ispitanika prema trajanju diabetesa				*P**
	≤ 1	1 − 2	> 2	Ukupno	
Hba1c					
Referentni interval	4 (57,1)	7 (33,3)	11 (15,5)	22 (22,2)	
Više od referentnog intervala	3 (42,9)	14 (66,7)	60 (84,5)	77 (77,8)	**0,02**
C-peptid					
Manje od referentnog intervala	7 (100)	19 (90,5)	65 (92,9)	91 (92,9)	
Referentni interval	0	2 (9,5)	3 (4,3)	5 (5,1)	0,86
Više od referentnog intervala	0	0	2 (2,9)	2 (2)	
Ukupno	7 (100)	21 (100)	70 (100)	99 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Vrijednosti su HMGB1 iznad referentne vrijednosti kod svih ispitanika. Nema značajnih razlika u raspodjeli ispitanika prema dobnim skupinama i referentnim vrijednostima cinka (Tablica 5.28).

Tablica 5.28. Raspodjela ispitanika prema referentnim intervalima cinka prema dobnim skupinama u eksperimentalnoj skupini

	Broj (%) ispitanika prema dobi				*P**
	≤ 10	11 − 15	≥ 16	Ukupno	
Cink					
Manje od referentnog intervala	15 (75)	33 (71,7)	25 (75,8)	73 (73,7)	0,91
Referentni interval	5 (25)	13 (28,3)	8 (24,2)	26 (26,3)	
HMGB1					
Više od referentnog intervala	20 (100)	48 (100)	33 (100)	101 (100)	−

*Fisherov egzaktni test

Usporedbom cinka i HMGB1 kod novootkrivenih (trajanje dijabetesa do 2 godine) i kroničnih bolesnika nije dokazana statistički značajna razlika u vrijednostima (Tablica 5.29).

Tablica 5.29. Srednje vrijednosti cinka i HMGB1 prema trajanju dijabetesa

	Medijan (interkvartilni raspon) prema trajanju bolesti			*P**
	Novootkriveni	Kroničari	Ukupno	
Cink [mmol/L]	11,4 (10,3 – 12,93)	11,2 (9,85 – 13,1)	10,7 (9,3 − 12,1)	0,63
HMGB1 [mg/ml]	7,8 (5 – 9,6)	6,7 (1,3 – 9,4)	8,7 (5,5 − 9,95)	0,09

*Mann-Whitneyjev U-test

Prema referentnim vrijednostima cinka, manje od referentne vrijednosti imaju značajnije ispitanici kojima bolest traje dulje od dvije godine (Fisherov egzaktni test, P = 0,02) (Tablica 5.30).

Tablica 5.30. Raspodjela ispitanika prema referentnim intervalima cinka prema trajanju bolesti u eksperimentalnoj skupini

	Broj (%) ispitanika prema trajanju bolesti			*P**
	Novootkriveni	Kroničari	Ukupno	
Cink				
Manje od referentnog intervala	16 (57,1)	57 (80,3)	73 (73,7)	**0,02**
Referentni interval	12 (42,9)	14 (19,7)	26 (26,3)	
HMGB1				
Više od referentnog intervala	28 (100)	71 (100)	99 (100)	−

*Fisherov egzaktni test

Usporedimo li vrijednosti prema tome traje li dijabetes do jedne, dvije ili više godina, značajno najnižu srednju vrijednost cinka, 10,3 (interkvartilnog raspona 9 – 11,7), imaju ispitanici kojima dijabetes traje dulje od dvije godine (Mann-Whitneyjev U-test, P = 0,04), a najviša je u ispitanika s dijabetesom u trajanju od 1 do 2 godine. Stalni je porast vrijednosti HMGB1 s trajanjem bolesti, što govori u prilog mogućih ranih komplikacija dijabetesa te se stoga može koristiti kao rani biomarker istih, iako nije dokazana značajna razlika (Tablica 5.31).

Tablica 5.31. Srednje vrijednosti cinka i HMGB1 prema trajanju dijabetesa

	Medijan (interkvartilni raspon) prema trajanju bolesti				*P**
	Do 1 godine	1 – 2 godine	Više od 2 godine	Ukupno	
Cink [mmol/L]	10,7 (10 – 11,1)	11,9 (10,5 – 13,3)	10,3 (9 – 11,7)	10,7 (9,3 − 12,1)	**0,04**
HMGB1 [mg/ml]	4,9 (4,6 – 9,2)	8,5 (5,4 – 9,95)	8,7 (6,7 – 10)	8,7 (5,5 − 9,95)	0,08

*Mann-Whitneyjev U-test

Od ukupno 73 (73,1 %) ispitanika s vrijednostima cinka manjim od njegova referentnog intervala, kod značajno više njih, 57 (80,3 %), bolest traje dulje od dvije godine (Fisherov egzaktni test, P = 0,04) (Tablica 5.32).

Tablica 5.32. Raspodjela ispitanika prema referentnim intervalima cinka u odnosu na trajanje bolesti u eksperimentalnoj skupini

	Broj (%) ispitanika prema trajanju bolesti				
	Do 1 godine	1 – 2 godine	Više od 2 godine	Ukupno	*P**
Cink					
Manje od referentnog intervala	5 (71,4)	11 (52,4)	57 (80,3)	73 (73,7)	**0,04**
Referentni interval	2 (28,6)	10 (47,6)	14 (19,7)	26 (26,3)	
HMGB1					
Više od referentnog intervala	7 (100)	21 (100)	71 (100)	99 (100)	−

*Fisherov egzaktni test

5.4. Odnos cinka i HMGB1 s ostalim parametrima

Kod svih je ispitanika eksperimentalne skupine (ŠBT1) Spearmanovim koeficijentom korelacije dokazana dobra negativna povezanost vrijednosti cinka s duljinom trajanja bolesti, odnosno dulje trajanje bolesti dovodi do smanjenja cinka u organizmu ($\rho = -0{,}296$ P = 0,003). Do povećanja cinka dolazi povećanjem željeza ($\rho = 0{,}376$ P < 0,001).

Kod ispitanika do 10 godina starosti s duljim trajanjem bolesti povećava se i HMGB1 ($\rho = 0{,}525$ P = 0,02). U ovoj se skupini ispitanika vrijednost cinka smanjuje povećanjem C-peptida ($\rho = -0{,}516$ P = 0,02), a HMGB1 se smanjuje kod povišenih albumina u urinu ($\rho = -0{,}465$ P = 0,04).

U dobnoj skupini od 11 do 15 godina (pubertet) nema statistički značajnih povezanosti

između cinka, HMBG1 i trajanja bolesti. Cink se smanjuje pri visokim vrijednostima Hba1c-a ($\rho = -0{,}355$ $P = 0{,}02$).

Ispitanici stariji od 15 godina (adolescenti) koji imaju dulje trajanje bolesti imaju znatno niže vrijednost cinka u organizmu ($\rho = -0{,}433$ $P = 0{,}01$). Kod ovih ispitanika jako je velika pozitivna veza cinka s vrijednosti željeza ($\rho = 0{,}711$ $P < 0{,}001$), jaka je pozitivna veza cinka s vrijednosti feritina ($\rho = 0{,}419$ $P = 0{,}02$), dok je negativna povezanost željeza s HMGB1 ($\rho = -0{,}359$ $P = 0{,}04$). Nema značajne razlike u raspodjeli ispitanika prema referentnim vrijednostima cinka i C-peptida i Hba1c-a (Tablica 5.33).

Tablica 5.33. Ispitanici prema referentnim intervalima C-peptida i Hba1c-a prema referentnim vrijednostima cinka

	Cink Broj (%) ispitanika			*P**
	Manje od referentnog intervala	Referentni interval	Ukupno	
C-peptid				
Manje od referentnog intervala	67 (93,1)	24 (92,3)	91 (92,9)	0,79
Referentni interval	3 (4,2)	2 (7,7)	5 (5,1)	
Više od referentnog intervala	2 (2,8)	0	2 (2)	
Ukupno	72 (100)	26 (100)	98 (100)	
Hba1c				
Referentni interval	13 (17,8)	9 (34,6)	22 (22,2)	0,10
Više od referentnog intervala	60 (82,2)	17 (65,4)	77 (7,8)	
Ukupno	73 (100)	26 (100)	99 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Nismo utvrdili značajan odnos između vrijednosti HMGB1 i cinka i upalnih biljega (leukocita, C-reaktivnog proteina, feritina i željeza) (Tablica 5.34).

Tablica 5.34. Raspodjela ispitanika prema referentnim intervalima hematoloških pretraga

	Cink Broj (%) ispitanika			*P**
	Manje od referentnog	Referentni interval	Ukupno	
Leukociti				
Manje od referentnog intervala	9 (12,3)	4 (15,4)	13 (13,1)	0,89
Referentni interval	62 (84,9)	21 (80,8)	83 (83,8)	
Više od referentnog intervala	2 (2,7)	1 (3,8)	3 (3)	
Ukupno	73 (100)	26 (100)	99 (100)	
CRP				
Referentni interval	65 (91,5)	25 (96,2)	90 (92,8)	0,67
Više od referentnog intervala	6 (8,5)	1 (3,8)	7 (7,2)	
Ukupno	71 (100)	26 (100)	97 (100)	
Željezo				
Manje od referentnog intervala	6 (8,2)	0	6 (6,1)	0,51
Referentni interval	66 (90,4)	26 (100)	92 (92,9)	
Više od referentnog intervala	1 (1,4)	0	1 (1)	
Ukupno	73 (100)	26 (100)	99 (100)	
Feritin				
Manje od referentnog intervala	4 (5,5)	0	4 (4)	0,29
Referentni interval	67 (91,8)	24 (92,3)	91 (91,9)	
Više od referentnog intervala	2 (2,7)	2 (7,7)	4 (4)	
Ukupno	73 (100)	26 (100)	99 (100)	

*Fisherov egzaktni test

5.5. Odnos magnezija i ostalih parametara

Značajno su više vrijednosti magnezija kod zdravih ispitanika (Mann-Whitneyjev U-test, P < 0,001), no nema značajne razlike prema dobi ispitanika, trajanju dijabetesa i prema tome jesu li vrijednosti cinka u referentnom intervalu ili ne (Tablica 5.35).

Tablica 5.35. Srednje vrijednosti magnezija prema podjelama

	Magnezij	
	Medijan (interkvartilni raspon)	*P**
Svi ispitanici	**0,82 (0,77 – 0,86)**	
Skupine ispitanika		
Kontrolna skupina	0,87 (0,83 – 0,90)	**< 0,001***
Eksperimentalna	0,80 (0,75 – 0,84)	
Dobne skupine		
≤ 10 godina	0,82 (0,75 – 0,86)	
11 – 15 godina	0,81 (0,76 – 0,86)	0,99†
≥ 16 godina	0,83 (0,78 – 0,89)	
Trajanje dijabetesa (godine)		
≤ 1 godine	0,75 (0,71 – 0,79)	
1 – 2 godine	0,82 (0,76 – 0,91)	0,14†
> 2 godine	0,80 (0,75 – 0,83)	
Trajanje dijabetesa (godine)		
Novootkriveni	0,79 (0,74 – 0,89)	0,67
Kroničari	0,80 (0,75 – 0,83)	
Cink		
Manje od referentnog intervala	0,80 (0,75 – 0,85)	0,09
Referentni interval	0,84 (0,81 – 0,89)	

*Mann-Whitneyjev U-test; †Kruskal-Wallisov test

Postoji značajna pozitivna povezanost između HMGB1 i magnezija ($\rho = 0,264$ P = 0,008), kao i magnezija s C-peptidom ($\rho = 0,329$ P = 0,001).

5.6. Antigeni HLA

Bolesti s autoimunom pozadinom povezane su s antigenom HLA. U eksperimentalnoj skupini detektiran je sveukupno 91 (90,1 %) ispitanik s nekim od HLD-DRB antigena, od kojih je 40 (87 %) muškog, a 51 (92,7 %) ženskog spola.

Prema vrsti antigena, najviše je HLA-DRB3, kod 66 (65,3 %) ispitanika, HLA-DRB4 kod 60 (59,4 %) ispitanika, a samo je 7 (6,9 %) ispitanika s HLA-DRB5 antigenom. Nema značajne razlike prema spolu (Tablica 5.36).

Tablica 5.36. Ispitanici prema antigenu HLA-DRB i spolu

Prisutni antigeni	Broj (%) ispitanika			*P**
	Dječaci	Djevojčice	Ukupno	
HLA-DRB3	31 (67,4)	35 (63,6)	66 (65,3)	0,83
HLA-DRB4	25 (54,3)	35 (63,6)	60 (59,4)	0,42
HLA-DRB5	3 (6,5)	4 (7,3)	7 (6,9)	> 0,99

*Fisherov egzaktni test

Najviše ispitanika, njih 38 (41,8 %), ima kombinaciju HLA-DRB3 + HLA-DRB4, a 25 (27,5 %) samo HLA-DRB3. Nema značajnih razlika prema spolu (Tablica 5.37).

Tablica 5.37. Ispitanici prema svim kombinacijama antigena HLA-DRB i spolu

Prisutni antigeni	Broj (%) ispitanika prema spolu			*P**
	Dječaci	Djevojčice	Ukupno	
HLA-DRB3	12 (30)	13 (25,5)	25 (27,5)	0,92
HLA-DRB4	8 (20)	13 (25,5)	21 (23,1)	
HLA-DRB5	1 (2,5)	2 (3,9)	3 (3,3)	
HLA-DRB3 + HLA-DRB4	17 (42,5)	21 (41,2)	38 (41,8)	
HLA-DRB3 + HLA-DRB5	2 (5)	1 (2)	3 (3,3)	
HLA-DRB4 + HLA-DRB5	0	1 (2)	1 (1,1)	

*Fisherov egzaktni test

S obzirom na referentne vrijednosti cinka, od ukupno 66 (66,7 %) ispitanika samo s HLA-DRB3 značajno ih je više s vrijednosti cinka manjom od referentne, njih 53 (72,6 %) (Fisherov egzaktni test, P = 0,04) (Tablica 5.38).

Tablica 5.38. Raspodjela ispitanika po HLA-DRB-u i vrijednosti cinka

Prisutni antigeni	**Cink** Broj (%) ispitanika			*P**
	Manje od referentnog intervala	Referentni interval	Ukupno	
HLA-DRB3	53 (72,6)	13 (50)	66 (66,7)	**0,04**
HLA-DRB4	45 (61,6)	15 (57,7)	60 (60,6)	0,82
HLA-DRB5	4 (5,5)	3 (11,5)	7 (7,1)	0,38

*Fisherov egzaktni test

5.7. Protutijela na β-stanice

Samoj pojavi dijabetesa prethodi dugi prikriveni autoimunosni proces selektivnog razaranja β-stanica gušterače, tzv. preddijabetes. Ispitanike eksperimentalne skupine testirali smo na: GAD protutijela na membranski protein β-stanica te IA-2 protutijela na tirozin fosfatazu.
Pozitivan nalaz IA-2 značajno su imali novootkriveni dijabetičari (Fisherov egzaktni test, P = 0,001) te značajnije ispitanici kojima dijabetes traje do 1 ili od 1 do 2 godine (Fisherov egzaktni test, P = 0,002) (Tablica 5.39).

Tablica 5.39. Ispitanici prema nalazu IA-2 i trajanju bolesti

	IA-2 Broj (%) ispitanika			*P**
	Negativno	Pozitivno	Ukupno	
Dijabetes				
Novootkriveni diabetes	8 (15,1)	20 (46,5)	28 (29,2)	**0,001**
Kroničari	45 (84,9)	23 (53,5)	68 (70,8)	
Ukupno	53 (100)	43 (100)	96 (100)	
Podjela prema trajanju				
Do 1 godine	2 (3,8)	5 (11,6)	7 (7,3)	
Od 1 do 2 godine	6 (11,3)	15 (34,9)	21 (21,9)	**0,002**
Kroničari	45 (84,9)	23 (53,5)	68 (70,8)	
Ukupno	53 (100)	43 (100)	96 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Pozitivan GAD nalaz nalazimo češće kod kroničara, no bez značajnosti (Tablica 5.40).

Tablica 5.40. Ispitanici prema nalazu GAD-a i trajanje bolesti

	Broj (%) ispitanika u odnosu na GAD			*P**
	Negativno	Pozitivno	Ukupno	
Diabetes				
Novootkriveni dijabetes	9 (22,5)	19 (33,9)	28 (29,2)	0,26
Kroničari	31 (77,5)	37 (66,1)	68 (70,8)	
Ukupno	40 (100)	56 (100)	96 (100)	
Podjela prema trajanju				
Do 1 godine	1 (2,5)	6 (10,7)	7 (7,3)	
Od 1 do 2 godine	8 (20)	13 (23,2)	21 (21,9)	0,31
Kroničari	31 (77,5)	37 (66,1)	68 (70,8)	
Ukupno	40 (100)	56 (100)	96 (100)	

*Fisherov egzaktni test

Značajno više ispitanika s novootkrivenim dijabetesom ima pozitivne vrijednosti IA-2 (Fisherov egzaktni test, P = 0,002), dok u GAD-65 i ICA-e nema značajnih razlika prema tome je li riječ o novootkrivenom dijabetesu ili o kroničarima (Tablica 5.41).

Tablica 5.41. Ispitanici prema nalazu GAD-65, IA-2 i ICA-e u odnosu na trajanje bolesti

	Broj (%) ispitanika			P*
	Novootkriveni dijabetes	Kroničari	Ukupno	
GAD-65				
Negativno	9 (32,1)	31 (45,6)	40 (41,7)	0,26
Pozitivno	19 (67,9)	37 (54,4)	56 (58,3)	
IA-2				
Negativno	8 (28,6)	45 (66,2)	53 (55,2)	**0,002**
Pozitivno	20 (71,4)	23 (33,8)	43 (44,8)	
ICA				
Negativno	3 (10,7)	14 (21,2)	17 (18,1)	0,38
Pozitivno	25 (89,3)	52 (78,8)	77 (81,9)	

*Fisherov egzaktni test

Nema značajnih razlika u vrijednostima GAD-65, IA-2 i ICA-e prema nalazu HMGB1, kako u skupini svih ispitanika, tako i kod novootkrivenih dijabetičara ili kod onih kojima dijabetes traje dulje od dvije godine (Tablica 5.42).

Tablica 5.42. Razlike u vrijednostima protutijela kod svih dijabetičkih pacijenata, te u odnosu na trajanje bolesti, prema HMGB1

	Medijan (interkvartilni raspon) HMGB1 [μg/L]		P*
	Negativan	Pozitivan	
Svi ispitanici			
GAD-65	8,7 (6,65 – 10,1)	8,7 (5,3 – 9,9)	0,61
IA-2	8,7 (5,3 – 9,9)	8,7 (5,5 – 10,0)	0,69
ICA	9 (7,7 – 10,1)	8,6 (5,3 – 9,9)	0,48
Novootkriveni dijabetes			
GAD-65	8,5 (5 – 10,8)	7,1 (5 – 9,6)	0,63
IA-2	5,05 (5 – 9,2)	8,6 (5,8 – 9,6)	0,30
ICA	5 (5 – 11)	8,5 (5,1 – 9,6)	0,83
Trajanje dijabetesa dulje od dvije godine			
GAD-65	8,9 (7,2 – 10,1)	9,0 (5,3 – 10,1)	0,79
IA-2	8,9 (6,8 – 10)	9,1 (5,5 – 10,4)	0,88
ICA	9,2 (8,6 – 10,1)	8,7 (5,8 – 10,2)	0,46

*Mann-Whitneyjev U-test

Relativni genski rizik kod pacijenata sa dijabeteseom tipa 1 višestruko je veći kod HLA-DRB3 i HLA-DRB4, dok kod HLA-DR5 nije pokazao povećani rizik (Tablica 5.43).

Tablica 5.43. Srednje vrijednosti cinka i HMGB1 prema prisutnosti antigena HLA-DRB

	Medijan (interkvartilni raspon)
HLA-DRB3	
Cink (n = 25)	10,7 (9,75 – 11,35)
HMBG1 (n = 25)	8,6 (5,35 – 9,4)
HLA-DRB4	
Cink (n = 21)	11,3 (9,7 – 13,3)
HMBG1 (n = 1)	8,5 (6 – 9,6)
HLA-DRB5	
Cink (n = 3)	8,7 (8 – 13,8)
HMBG1 (n =)	5 (2,6 – 6,8)
HLA-DRB3 + HLA-DRB4	
Cink (n = 38)	10,4 (8,87 – 11,7)
HMBG1 (n = 8)	9,1 (6,4 – 11,35)
HLA-DRB3 + HLA-DRB5	
Cink (n = 3)	15 (10,6 – 15,3)
HMBG1 (n =)	9,5 (7,3 – 9,8)
HLA-DRB4 + HLA-DRB5	
Cink (n = 1)	11,6
HMBG1 (n = 1)	5,1

6. RASPRAVA

Šećerna bolest tipa 1 razvija se kao posljedica složenog međudjelovanja niza gena i okolišnih čimbenika. Istraživanjem se željelo povezati utjecaj navedenih vanjskih čimbenika s razvitkom tipa 1 šećerne bolesti, odnosno s osnovnim patofiziološkim mehanizmom nastanka ŠBT1 u koji je uključen i proupalni čimbenik HMGB1. Uloga aktivacije sustava urođene imunosti te posljedične kronične upale s razvojem inzulitisa ključna je u nastanku šećerne bolesti tipa 1 i još uvijek je predmetom intenzivnog istraživanja. Proupalni medijator HMGB1 i cink odabrani su zbog svog utjecaja na moguću aktivaciju upale, odnosno na razvoj inzulitisa, čime se željelo dodatno istražiti njihov utjecaj na sklonost razvoju šećerne bolesti tipa 1.

6.1. Upala u šećernoj bolesti tipa 1

Posljednjih je godina sve više podataka koji ukazuju na to da bi kronična upala niskog stupnja aktivnosti mogla biti potencijalni pokazatelj nastanka inzulitisa u ranoj preddijabetičkoj fazi bolesti. ili isključivanja prisutnosti akutnih upalnih zbivanja. Od upalnih su se parametara ispitanicima određivale vrijednosti leukocita i CRP-a (C-reaktivnog proteina). CRP je cirkulirajući upalni parametar, sintetiziran dominantno od strane jetrenih stanica kao odgovor na stimulaciju IL-6. Uz izrazito povišene vrijednosti u stanjima akutnih infekcija ili sistemskih upala, niže ali kronično povišene razine CRP-a mogu predstavljati relativno stabilni indikator kronične upale. U ovom je radu u objema skupinama ispitanika analiziran niz pokazatelja upalne aktivnosti u cilju potvrde niskog stupnja aktivnosti kroz duži period. Povišene razine cirkulirajućeg CRP-a nalaze se u adipoznih osoba i koreliraju sa stupnjem hipertofije adipocita (290). Više koncentracije cirkulirajućeg CRP-a nalaze se i u odraslih osoba s metaboličkim sindromom i predstavljaju zaseban čimbenik rizika za razvitak šećerne bolesti tipa 2 (291). U svojem su istraživanju Piccirillo i suradnici, provedenom na 48 pacijenata sa ŠBT1 prosječne starosti 19 godina te s prosječnom duljinom bolesti od 5 godina, koji pritom nisu imali razvijene komplikacije bolesti kao što su mikroalbuminurija, retinopatija i klinički razvijene makrovaskularne bolesti, pokazali blago povišene vrijednosti u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika, ali su vrijednosti CRP-a bile unutar referentnih (0.23 mg/L), ne smatrajući se stoga pokazateljem upale (292). Prema našim saznanjima, nije provedeno istraživanje koje bi jednoznačno pokazalo bi li visokoosjetljivi CRP (hsCRP) bio bolji pokazatelj upale u djece s razvijenom ŠBT1, bez razvijenih

komplikacija bolesti. U populaciji ispitivane djece u našem istraživanju nisu uočene značajne razlike u vrijednostima upalnih biljega između eksperimentalne i kontrolne skupine, no za naglasiti je kako je većina ispitanika imala indeks tjelesne mase unutar referentnog raspona, čime je eliminiran i mogući utjecaj pretilosti na povišenu vrijednost CRP-a.

6.2. Značaj cinka u razvitku šećerne bolesti tipa 1

Istraživanja usmjerena na pručavanje promjene homeostaze cinka u organizmu uslijed kroničnih stanja kao što su šećerna bolest tipa 2 i pretilost manje su brojna, a rezultati su manje konzistentni. Poznato je da cink ima važnu ulogu u β-stanicama gušterače preko sinteze, spremanja i lučenja inzulina, a razina je cinka kontrolirana cinkovim transporterima, koji sudjeluju u apsorpciji, skladištenju i distribuciji cinka (293). Skalnaya i suradnici u svojem su istraživanju pokazali sniženu razinu serumskoga cinka u postmenopauzalnih žena sa šećernom bolesti tipa 2, ukazujući na moguću ulogu cinka u patogenezi ove bolesti (294). Postoje istraživanja koja su pokazala da svakodnevna suplementacija cinka hranom i dodatcima prehrani poboljšava kontrolu glikemije u osoba sa šećernom bolesti tipa 2, smanjujući značajno HbA1c u tih pojedinaca (295). Dosadašnja su istraživanja pokazala kako je cink u organizmu jedan od elemenata u tragovima koji na višestruke načine igra ulogu u patogenezi i progresiji šećerne bolesti tipa 2, kao i u njezinim komplikacijama. Niechcial i suradnici u svojem su istraživanju provedenom na pedijatrijskoj i odrasloj populaciji, gledajući pedijatrijsku populaciju, dobili 80 % pozitivnu detekciju ZnT8 protutijela, dok su isto zamijetili u puno manjemu postotku kod odraslih ispitanika, pokazujući tako potencijalnu ulogu ZnT8 u identificiranju heterogenosti kao i njegove potencijalne uloge kao markera u začetku ŠBT1 u djece (296). U istraživanju provedenom na 100 dijabetičke djece ispitivanja su pokazala smanjene razine elemenata u tragovima u serumu, pa tako i cinka, u eksperimentalnoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu. Takvi su rezultati u skladu s drugim sličnim istraživanjima, a moguća su posljedica slabije apsorpcije cinka kod te djece (297). Prema našim saznanjima, naše je istraživanje među prvima koje je ispitalo razinu cirkulirajućega cinka u pacijenata sa šećernom bolesti tipa 1 u pedijatrijskoj populaciji, pokazavši ne samo da djeca sa šećernom bolesti tipa 1 imaju nižu razinu cinka u organizmu u odnosu na zdravu djecu, nego i da količina smanjenja razine cinka u djece oboljele od šećerne bolesti tipa 1 pokazuje korelaciju s duljinom trajanja bolesti. Stoga se da sugerirati da cink

ima važnu ulogu i u patogenezi šećerne bolesti tipa 1 u pedijatrijskoj populaciji, a daljnje mehanizme kojima je uključen u tu patogenezu predstoji još istražiti.

6.3. Značaj magnezija u razvitku šećerne bolesti tipa 1

Dosadašnja su istraživanja uputila na važnu imunomodulatornu ulogu magnezija u upalnim procesima, ukazujući tako na njegovu moguću važnost u brojnim bolestima koje imaju autoimunu podlogu, kao što je i ŠBT1. Sugimoto i suradnici u svojem su istraživanju pokazali kako je magnezij iz MgSO4 doveo do smanjenja produkcije citokina u žena nakon poroda, kao i u terminske i predterminske novorođenčadi, pokazujući time svoju važnost u populaciji koja je naročito izložena upalama i drugim ishodima kojima su upale u podlozi (298). Ozcaliskan i suradnici u svojem su istraživanju pokazali snižene vrijednosti magnezija u krvi u pacijenata sa ŠBT2, što su pripisali lošijoj metaboličkoj kontroli u tih pacijenata (299). Smatra se da je snižena razina magnezija u pacijenata s kroničnim bolestima moguća posljedica njegove promijenjene tubularne reapsorpcije, kao i lošije apsorpcije u crijevima zbog početnih kroničnih promjena na organizmu koje nastaju uslijed šećerne bolesti. U pretraživanju literature nismo naišli na istraživanje koje bi potvrdilo tu pretpostavku iako postoje istraživanja koja pokazuju povezanost snižene razine magnezija u krvi i nefrokalcinoze, gdje uslijed renalnog tubularnog oštećenja dolazi do ekscesivnog gubitka magnezija urinom (300). Rezultati su našeg istraživanja pokazali sniženu razinu magnezija u krvi u našoj ispitivanoj populaciji, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima i može upućivati na važnost magnezija u predviđanju i otkrivanju ranih stadija ŠBT1 u pedijatrijskoj populaciji.

6.4. Utjecaj alarmina HMGB1 na razvitak šećerne bolesti tipa 1

Cirkulacijski biomarkeri imaju sve veći značaj u složenim slučajevima prognoze, predviđanja i praćenja terapije u raznim bolestima. Iako je za mnoge biomarkere dokazano da imaju imunomodulacijske sposobnosti, njihova uloga u autoimunim bolestima od nedavno je postala predmetom velikog interesa. U cilju dobivanja pouzdanih podataka u kliničkoj praksi i vrednovanju stalnih promjena u aktivnosti bolesti kao i u terapijskoj procjeni, cirkulirajući biomarkeri mogli bi postati ekonomični i pouzdani pokazatelji patološkog stanja. Brojni su raz-

lozi za proučavanje uloge HMGB1 i ostalih alarmina, kao i mikronutrijenata u tipu 1 šećerne bolesti, prije svega radi boljeg razumijevanja etiologije i patogenetskih mehanizama nastanka ŠBT1, prepoznavanja mogućih biomarkera sklonosti razvitku ove bolesti te procjene njihovog utjecaja u odnosu na ostale utvrđene čimbenike rizika, kao i sklonosti razvitku kroničnih komplikacija dijabetesa. Na kraju, smisao je ovakvoga istraživanja u prepoznavanju mogućih novih ciljeva za terapeutske intervencije, kao i prepoznavanje novih strategija za prevenciju bolesti (novi mogući terapeutici koji prvenstveno djeluju na način da blokiraju aktivnost pojedinih proupalnih citokina na ciljnoj stanici, odnosno blokiraju citokinski receptor ili blokiraju postreceptorni učinak pojedinog citokina unutar same stanice). Mnogi odvojeni terapijski modaliteti koji neutraliziraju aktivnost izvanstaničnog HMGB1 ili njegovih receptora ili otpuštanja izvanstaničnog HMGB1 uspješno su primijenjeni u različitim modelima artritisa: npr. anakirna, rekombinatni antagonist humanog IL-1 receptora, čija primjena ima pozitivan učinak na regulaciju glikemije, sekretornu funkciju β-stanica te redukciju markera sustavne upale (169); IKKβ inhibitor, koji reducira IL-1β uzrokovanu apoptozu β-stanica te gubitak inzulinske sekrecije (170); neutralizirajuća antitijela za IL-6 (170); CPSI-306 inhibicijski čimbenik migracije makrofaga (171) ili na način da nadomještaju manjak pojedinih protuupalnih citokina kao što je terapija rekombinantnim adiponektinom (172).

Dosadašnja su istraživanja pokazala važnu ulogu HMGB1 u patofiziologiji pretilosti, inzulinske rezistencije i disfunkcije otočića gušterače, u životinjskih kao i u ljudskih modela. Pachydaki i suradnici proučili su povišenu ekspresiju ovoga proteina u retinama dijabetičkih pacijenata, ali i u štakora koji su imali retinopatiju (301). Također je Hagiwara sa svojim suradnicima potvrdio povišenje serumske razine HMGB1 u hiperglikemiji izazvanoj infuzijom glukoze u životinjskim modelima štakora (302). S druge su strane Tsoyi i suradnici pokazali da metformin značajno smanjuje ekspresiju HMGB1 u stanicama miševa tretiranih lipopolisaharidima (303). Također, raste broj dokaza koji nastoje rasvijetliti ulogu HMGB1 u masnome tkivu, kao što je aktivacija proinflamatornih makrofaga. Istraživanje koje je proučavalo pretilu djecu pokazalo je pozitivnu korelaciju pretilosti s povišenom razinom serumskoga HMGB1, te također povezanost s brojnim proupalnim citokinima, poput IL-6 i TNF-a (304). Istraživanje Kanellakisa i suradnika pokazalo je da davanjem anti-HMGB1 protutijela vodi k redukciji sadržaja makrofaga u aterosklerotskim lezijama u Apo-E deficijentnih miševa (305). Dosadašnjim je istraživanjima dobro opisan utjecaj HMGB1 na makrofage, kao i stimulacija makrofaga produkcijom proinflamatornih citokina potaknutih s

HMGB1, što vodi k povećanju upale u masnome tkivu i inzulinskoj rezistenciji. Nadalje, kardiovaskularne su komplikacije, poput koronarne arterijske bolesti i dijabetičke kardiomiopatije, postale jedne od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta u bolesnika s dijabetesom tipa 2. Sve je veći broj istraživanja koja upućuju na važnu ulogu HMGB1 u formaciji plaka, rupturi i trombozi, što su patološka stanja karakteristična za koronarnu arterijsku bolest, pokazujući povišene vrijednosti cirkulirajućeg HMGB1 u koronarnim bolestima (306). Također, povišene su vrijednosti cirkulirajućeg HMGB1 pronađene i u drugim komplikacijama dijabetesa tipa 2, kao što je dijabetička nefropatija. Ne samo da je uključen u aktivaciju proinflamatornih citokina u renalnim mezangijalnim stanicama, nego su istraživanja pokazala da je uključen i u fibrotični proces koji se odvija kod dijabetičke nefropatije (307).

Sva su ova dosadašnja istraživanja uputila na ulogu i važnost HMGB1 u razvoju šećerne bolesti tipa 2, pretilosti i drugih kroničnih upalnih stanja, kao i njihovih komplikacija, od upalnih procesa u masnome tkivu do kardiovaskularnih procesa i dijabetične nefropatije. Prema našemu saznanju, naše je istraživanje prvo koje se usmjerilo na proučavanje razine cirkulirajućeg serumskog HMGB1 u pedijatrijskoj populaciji sa šećernom bolesti tipa 1, pritom proučivši i važnost same razine serumskoga HMGB1 u odreĐivanju stadija i dužine same bolesti u pedijatrijskoj populaciji. Nedavna su istraživanja upućivala na to da je HMGB1 ključan posrednik u patogenezi i mnogih drugih bolesti kao što su sepsa, maligne bolesti, kronična bolest bubrega te juvenilni reumatski artritis u djece gdje je povišena razina alarmina HMGB1 zabilježena uz sniženu serumsku razinu sRAGE receptora (255). Sličan nalaz povišene serumske razine HMGB1 zabilježen je i u djece oboljele od Kawasakijeve bolesti (308). Sva ta stanja imaju vezu s upalom. Budući da je ŠBT1 takoĐer upalni proces, razumno je očekivati veće koncentracije HMGB1. Han i suradnici pokazali su u pokusima na životinjskim modelima da HMBG1 djeluje kao moćni urođeni imunološki posrednik koji pridonosi progresiji autoimuna procesa tijekom razvoja ŠBT1. Ovi istraživači također su pokazali da se HMBG1 može pasivno osloboditi iz oštećenih β-stanica gušterače ili aktivno izlučiti iz upalnih stanica infiltriranih unutar Langeharsovih otočića. Također su otkrili da se blokiranjem HMGB1 značajno inhibira napredovanje upalnog procesa, odnosno inzulitisa, i razvoj dijabetesa kod NOD miševa (7). Ovi rezultati mogu biti od interesa za razvoj novih terapijskih strategija za ublažavanje ili sprječavanje ŠBT1 i u određenoj mjeri opravdati potencijalnu vrijednost njegova mjerenja. Drugo istraživanje Arrigoa i suradnika pokazalo je važnu ulogu HMBG1 u upalnom procesu povezanom s pretilosti u djetinjstvu (304). Uočili

su iznimno visoke vrijednosti HMBG1 koje su bile povezane s povišenom aktivnosti IL-6, TNFα, IL-18, rezistina i adiponektina i u korelaciji s BMI-om. Međutim, koncentracije HMGB1 u našoj studiji nisu bile povezane s vrijednostima BMI-a, s obzirom na to da je populacija ispitivane djece sa ŠBT1 imala BMI unutar referentnih vrijednosti za dob. Na ovaj je način posredno eliminiran učinak upale zbog pretilosti. Zanimljivo je da nema nikakve korelacije između HbA1c-a i HMGB1, usprkos pozitivnoj korelaciji među njima zabilježenoj u nekim prethodnim istraživanjima rađenim u odrasloj populaciji pretilih sa ŠBT2 (309).

Zaključno, naši rezultati pokazuju značajno veće vrijednosti HMGB1 kod djece sa ŠBT1. Taj je učinak osobito izražen u djece kod koje je bolest trajala više od jedne godine. Navedeni rezultati svrstavaju ovaj protein u kategoriju mogućih biomarkerskih kandidata za otkrivanje nespecifične imunološke aktivacije u ŠBT1. Prema našem saznanju, ovo je istraživanje prvo koje je pokazalo odnos između HMGB1 i ŠBT1 u djece. Daljnja su istraživanja potrebna za potvrđivanje naših preliminarnih rezultata, kako bi se odredilo vrijeme pojavljivanja HMGB1 u razvoju bolesti i razjasnilo ulogu HMGB1 u patogenezi autoimune inicijacije u ŠBT1. Navedeno upućuje i na mogućnost uspješne prevencije bolesti utječući na mogući terapeutski cilj. Ovo istraživanje ima neka značajna ograničenja, kao što je relativno mali broj uključene djece, nasumični odabiri istraživanih skupina i usporedba djece koja boluju od ŠBT1 samo s onima bez ikakvih drugih upalnih stanja.

7. ZAKLJUČCI

– Djeca sa ŠBT1 imaju statistički značajno višu razinu serumskog HMGB1 u usporedbi s kontrolnom skupinom djece bez ŠBT1. To govori u prilog tome da HMGB1 kao medijator prirođene imunosti može biti uključen u imunopatogenezu autoimunog dijabetesa. Navedeno doprinosi tezi o prevladavajućoj ulozi prirođenog imunosnog sustava u imunopatogenetskom mehanizmu nastanka ŠBT1.

– Razina HMGB1 statistički je veća kod djece s dužim trajanjem ŠBT1. Određivanje razine HMGB1 moglo bi biti korisno u procjenjivanju aktivnosti bolesti, pri čemu bi visoka razina HMGB1 označavala povišen stupanj aktivnosti bolesti, odnosno inzulitisa.

– Značajno nižu razinu cinka ima skupina djece sa ŠBT1 u odnosu na kontrolnu skupinu zdrave djece. Budući da je cink uključen u brojne stanične procese, pa tako i u sintezu i transport inzulina, njegov relativni manjak mogao bi imati utjecaja i u patogenetskim mehanizmima nastanka ŠBT1.

– Usporedbom vrijednosti cinka prema dužini trajanja ŠBT1, značajno najnižu srednju vrijednost cinka imaju ispitanici kojima bolest traje duže od dvije godine. Navedeno može upućivati na pojačan gubitak cinka putem bubrega, što može biti rani pokazatelj razvoja početnih kroničnih komplikacija ŠBT1.

– Povišena serumska razina HMGB1 u početnoj fazi nastanka ŠBT1 može se iskoristiti kao potencijalni biomarker upale u ranoj dijagnostici ŠBT1 prije drugih klasičnih upalnih pokazatelja (ubrzane sedimentacije eritrocita, povišene razine C-reaktivnog proteina ili leukocita).

8. SAŽETAK

Ciljevi: Cilj je ovog ispitivanja bio istražiti ulogu cinka i alarmina HMGB1 u razvitku šećerne bolesti tipa 1. Dokazana je uključenost proteina visoke mobilnosti iz skupine 1 (HMGB1) u raznim autoimunim i upalnim bolestima, međutim uloga ove proinflamatorne molekule kod djece sa šećernom bolesti tipa 1 (ŠBT1) nije do sada bila razjašnjena. Također je cilj bio usporediti razinu serumskog HMGB1 u djece u ranim fazama ŠBT1 (skupina 1) i onih s dužim trajanjem bolesti (skupina 2) s kontrolnom skupinom bez ŠBT1 ili drugih autoimunuh bolesti.

Dizajn studije: Presječno ispitivanje

Ispitanici: Ovo israživanje uključuje 141 dijete: skupina 1 (N = 28), skupina 2 (N = 73) i kontrolna skupina (N = 40).

Materijali i metode*:* Mjerenja su uzeta iz seruma za sljedeće: HMGB1, cink, broj bijelih krvnih stanica, C-reaktivni protein, glukoza, hemoglobin A1C i β-stanična protutijela (GADA-65, IA-2, ICA).

Rezultati: Djeca sa ŠBT1 imaju statistički značajno višu razinu serumskog HMGB1 (8,7 ug/L) u usporedbi s kontrolnom skupinom djece bez ŠBT1 (1,0 ug/L). Razina HMGB1 statistički je veća kod djece s dužim trajanjem bolesti (skupina 2: 8,7 ug/l, $P < 0,001$). Značajno nižu razinu cinka ima skupina djece sa ŠBT1 (10,7) u odnosu na kontrolnu skupinu (12,85). Usporedbom vrijednosti cinka s dužinom trajanja dijabetesa, značajno najnižu srednju vrijednost cinka (10,3 interkvartilnog raspona 9 – 11,7) imaju ispitanici kojima dijabetes traje duže od dvije godine.

Zaključak: Viša razina HMGB1 u djece s ŠBT1 ukazuje na to da ova proinflamatorna molekula može poslužiti kao biomarker upale kod bolesnika s dijabetesom i može biti bolji marker u usporedbi s drugim reaktantima upale.

Ključne riječi: protein visoke mobilnosti iz skupine 1, šećerna bolest tipa 1, upala, djeca

9. SUMMARY

Objectives: The aim of this study was to investigate the role of zinc and HMGB1 alarmin in the development of Type 1 diabetes. The involvement of the high-mobility group box 1 protein (HMGB1) in various autoimmune and inflammatory diseases has been documented before. However, the role of this proinflammatory molecule in children with diabetes type 1 (T1DM) has not been clarified so far. The aim of this study was to compare the level of serum HMGB1 in children within the early (Group 1) and late (Group 2) stages of T1DM, with the control group of children without T1DM or any other autoimmune disease.

Study design: A cross-sectional study.

Participants: The study included 141 children: Group 1 (N=28), Group 2 (N=73) and Control group (N=40).

Materials and Methods: The measurements were made on serum samples for: HMGB1, zinc, white blood cell count, C-reactive protein, glucose, haemoglobin A1C, and β-cells autoantibodies (GADA-65, IA-2, ICA).

Results: The children with T1DM had a statistically significant higher serum levels of HMGB1 (experimental group: 8.7 μg/l) compared to the children without T1DM (control group: 1.0). The HMGB1 level was statistically higher in children with a longer disease duration (Group 1: 4.9 μg/l; Group 2: 8.7 μg/l, $P < 0.001$). The children with T1DM had significantly lower zinc levels (10.7) compared to the control group (12.85). Comparing the zinc values according to the duration of diabetes, the subjects with diabetes which lasts for more than two years have the significantly lowest mean zinc levels (10.3 of the interquartile range 9 – 11.7).

Conclusion: The higher level of HMGB1 in children with T1DM indicates that this proinflammatory molecule can serve as an inflammatory biomarker in patients with diabetes and may be a better marker compared to other inflammatory reactants.

Key words: high-mobility group box 1 protein; type 1 diabetes; inflammation; children.

10. LITERATURA

1. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G, Group ES. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989–2003 and predicted new cases 2005–20: a multicentre prospective registration study. The Lancet. 2009;373(9680):2027-33.
2. Foulis A, Stewart J. The pancreas in recent-onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: insulin content of islets, insulitis and associated changes in the exocrine acinar tissue. Diabetologia. 1984;26(6):456-61.
3. Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin – dependent diabetes mellitus. Diabetes/Metabolism Research and Reviews. 1998;14(2):129-51.
4. Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. Trends in immunology. 2007;28(10):429-36.
5. Foulis A, Liddle C, Farquharson M, Richmond J, Weir R. The histopathology of the pancreas in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. Diabetologia. 1986;29(5):267-74.
6. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. Current opinion in immunology. 2005;17(4):359-65.
7. Han J, Zhong J, Wei W, Wang Y, Huang Y, Yang P, et al. Extracellular high-mobility group box 1 acts as an innate immune mediator to enhance autoimmune progression and diabetes onset in NOD mice. Diabetes. 2008;57(8):2118-27.
8. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care. 2013;36(Supplement 1):S67-S74.
9. Kronenberg HM, Polonsky KS, Larsen PR, Melmed S. Williams Textbook of Endocrinology, 12/e: Elsevier India; 2007.
10. Sabbah E, Savola K, Ebeling T, Kulmala P, Vähäsalo P, Ilonen J, et al. Genetic, autoimmune, and clinical characteristics of childhood-and adult-onset type 1 diabetes. Diabetes care. 2000;23(9):1326-32.
11. Howson JM, Stevens H, Smyth DJ, Walker NM, Chandler KA, Bingley PJ, et al. Evidence that HLA class I and II associations with type 1 diabetes, autoantibodies to GAD and autoantibodies to IA-2, are distinct. Diabetes. 2011;60(10):2635-44.
12. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes care. 2004;27(5):1047-53.
13. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. Endocrinology and metabolism clinics of North America. 2010;39(3):481-97.

14. Flier JS, Underhill LH, Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. New England Journal of Medicine. 1986;314(21):1360-8.
15. Wilkin T. The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between type I and type II diabetes. Diabetologia. 2001;44(7):914-22.
16. Bruno G, Gruden G, Songini M. Incidence of type 1 diabetes in age groups above 15 years: facts, hypothesis and prospects for future epidemiologic research. Acta diabetologica. 2016:1-9.
17. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. Diabetes care. 2000;23(10):1516-26.
18. De Beaufort C. Incidence and trends of childhood type 1 diabetes worldwide 1990-1999. Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association. 2006;23(8):857-66.
19. Group EAS. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. The Lancet. 2000;355(9207):873-6.
20. Levy-Marchal C, Patterson C, Green A, Group EAS. Geographical variation of presentation at diagnosis of type I diabetes in children: the EURODIAB study. Diabetologia. 2001;44(3):B75-B80.
21. Liese AD, D'Agostino Jr RB, Hamman RF, Kilgo PD, Lawrence JM, Liu LL, et al. The burden of diabetes mellitus among US youth: prevalence estimates from the SEARCH for Diabetes in Youth Study. Pediatrics. 2006;118(4):1510-8.
22. Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton BM. Nelson textbook of pediatrics e-book: Elsevier Health Sciences; 2007.
23. Libman IM, LaPorte RE, Becker D, Dorman JS, Drash AL, Kuller L. Was there an epidemic of diabetes in nonwhite adolescents in Allegheny County, Pennsylvania? Diabetes Care. 1998;21(8):1278-81.
24. Stipancic G, Sabolic LLG, Malenica M, Radica A, Skrabic V, Tiljak MK. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes in Croatia from 1995 to 2003. diabetes research and clinical practice. 2008;80(1):122-7.
25. Rojnic Putarek N, Ille J, Spehar Uroic A, Skrabic V, Stipancic G, Krnic N, et al. Incidence of type 1 diabetes mellitus in 0 to 14 – yr – old children in Croatia–2004 to 2012 study. Pediatric diabetes. 2015;16(6):448-53.
26. Weets I, De Leeuw IH, Du Caju MV, Rooman R, Keymeulen B, Mathieu C, et al. The incidence of type 1 diabetes in the age group 0–39 years has not increased in Antwerp (Belgium) between 1989 and 2000: evidence for earlier disease manifestation. Diabetes Care.

2002;25(5):840-6.
27. Patterson C, Dahlquist G, Soltesz G, Green A, Group EAS. Is childhood-onset type I diabetes a wealth-related disease? An ecological analysis of European incidence rates. Diabetologia. 2001;44(3):B9-B16.
28. Weiss ST. Eat dirt—the hygiene hypothesis and allergic diseases. Mass Medical Soc; 2002.
29. Pundziute-Lyckå A, Dahlquist G, Nyström L, Arnqvist H, Björk E, Blohme G, et al. The incidence of type I diabetes has not increased but shifted to a younger age at diagnosis in the 0–34 years group in Sweden 1983 to 1998. Diabetologia. 2002;45(6):783-91.
30. Vandewalle CL, Coeckelberghs MI, De Leeuw IH, Du Caju MV, Schuit FC, Pipeleers DG, et al. Epidemiology, Clinical Aspects, and Biology of IDDM Patients Under Age 40 Years: Comparison of data from Antwerp with complete ascertainment with data from Belgium with 40% ascertainment. The Belgian Diabetes Registry. Diabetes care. 1997;20(10):1556-61.
31. Thunander M, Petersson C, Jonzon K, Fornander J, Ossiansson B, Torn C, et al. Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults and children in Kronoberg, Sweden. Diabetes research and clinical practice. 2008;82(2):247-55.
32. Haller MJ, Atkinson MA, Schatz D. Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management. Pediatric Clinics of North America. 2005;52(6):1553-78.
33. Leslie RDG, Williams R, Pozzilli P. Type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults: one end of the rainbow. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2006;91(5):1654-9.
34. Palmer JP, Hirsch IB. What's in a Name Latent autoimmune diabetes of adults, type 1.5, adult-onset, and type 1 diabetes. Diabetes Care. 2003;26(2):536-8.
35. Soltesz G, Patterson C, Dahlquist G. Worldwide childhood type 1 diabetes incidence–what can we learn from epidemiology? Pediatric diabetes. 2007;8(s6):6-14.
36. Green A, Gale E, Patterson C. Incidence of childhood-onset insulin-dependent diabetes mellitus: the EURODIAB ACE Study. The Lancet. 1992;339(8798):905-9.
37. Karvonen M, Pitkäniemi M, Pitkäniemi J, Kohtamäki K, Tajima N, Tuomilehto J. Sex difference in the incidence of insulin–dependent diabetes mellitus: an analysis of the recent epidemiological data. Diabetes/metabolism reviews. 1997;13(4):275-91.
38. Kautzky-Willer A. Sex and gender differences in endocrinology. Sex and Gender Aspects in Clinical Medicine: Springer; 2012. p. 125-49.
39. Weets I, De Leeuw IH, Du Caju MV, Rooman R, Keymeulen B, Mathieu C, et al. The

Incidence of Type 1 Diabetes in the Age Group 0–39 Years Has Not Increased in Antwerp (Belgium) Between 1989 and 2000 Evidence for earlier disease manifestation. Diabetes care. 2002;25(5):840-6.

40. Kyvik KO, Nystrom L, Gorus F, Songini M, Oestman J, Castell C, et al. The epidemiology of type 1 diabetes mellitus is not the same in young adults as in children. Diabetologia. 2004;47(3):377-84.

41. Mayer-Davis EJ, Bell RA, Dabelea D, D'Agostino R, Imperatore G, Lawrence JM, et al. The many faces of diabetes in American youth: type 1 and type 2 diabetes in five race and ethnic populations: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. Diabetes Care. 2009;32(Supplement 2):S99-S101.

42. Robinson J, Waller MJ, Parham P, de Groot N, Bontrop R, Kennedy LJ, et al. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. Nucleic acids research. 2003;31(1):311-4.

43. Major M. Human leukocyte antigen explained.

44. Rowe PA, Campbell-Thompson ML, Schatz DA, Atkinson MA, editors. The pancreas in human type 1 diabetes. Seminars in immunopathology; 2011: Springer.

45. Virtanen SM, Knip M. Nutritional risk predictors of β cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age. The American journal of clinical nutrition. 2003;78(6):1053-67.

46. Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Pociot F, et al. Type 1 diabetes evidence for susceptibility loci from four genome-wide linkage scans in 1,435 multiplex families. Diabetes. 2005;54(10):2995-3001.

47. Vehik K, Hamman RF, Lezotte D, Norris JM, Klingensmith GJ, Rewers M, et al. Trends in high-risk HLA susceptibility genes among Colorado youth with type 1 diabetes. Diabetes Care. 2008;31(7):1392-6.

48. Hermann R, Knip M, Veijola R, Simell O, Laine A-P, Åkerblom H, et al. Temporal changes in the frequencies of HLA genotypes in patients with Type 1 diabetes—indication of an increased environmental pressure? Diabetologia. 2003;46(3):420-5.

49. Redondo MJ, Fain PR, Eisenbarth GS. Genetics of type 1A diabetes. Recent progress in hormone research. 2000;56:69-89.

50. Redondo MJ, Jeffrey J, Fain PR, Eisenbarth GS, Orban T. Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. New England Journal of Medicine. 2008;359(26):2849-50.

51. Gillespie KM, Gale EA, Bingley PJ. High familial risk and genetic susceptibility in early onset childhood diabetes. Diabetes. 2002;51(1):210-4.

52. Steck AK, Barriga KJ, Emery LM, Fiallo-Scharer RV, Gottlieb PA, Rewers MJ. Secondary attack rate of type 1 diabetes in Colorado families. Diabetes care. 2005;28(2):296-300.
53. Tsirogianni A, Pipi E, Soufleros K. Specificity of islet cell autoantibodies and coexistence with other organ specific autoantibodies in type 1 diabetes mellitus. Autoimmunity reviews. 2009;8(8):687-91.
54. Barker JM. Type 1 diabetes-associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2006;91(4):1210-7.
55. Östman J, Lönnberg G, Arnqvist H, Blohme G, Bolinder J, Schnell AE, et al. Gender differences and temporal variation in the incidence of type 1 diabetes: results of 8012 cases in the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden 1983–2002. Journal of internal medicine. 2008;263(4):386-94.
56. Kappy MS, Geffner ME. Principles and practice of pediatric endocrinology: Charles C Thomas Publisher; 2005.
57. Pundziūtė-Lyckå A, Urbonaitė B, Dahlquist G. Infections and risk of Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus in Lithuanian children. Diabetologia. 2000;43(10):1229-34.
58. Goldberg E, Krause I. Infection and type 1 diabetes mellitus—a two edged sword? Autoimmunity reviews. 2009;8(8):682-6.
59. Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. Diabetologia. 2005;48(7):1247-57.
60. Mohr S, Garland C, Gorham E, Garland F. The association between ultraviolet B irradiance, vitamin D status and incidence rates of type 1 diabetes in 51 regions worldwide. Diabetologia. 2008;51(8):1391-8.
61. Stene L, Ulriksen J, Magnus P, Joner G. Use of cod liver oil during pregnancy associated with lower risk of Type I diabetes in the offspring. Diabetologia. 2000;43(9):1093-8.
62. Stene LC, Joner G, Group NCDS. Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study. The American journal of clinical nutrition. 2003;78(6):1128-34.
63. Kumar J, Muntner P, Kaskel FJ, Hailpern SM, Melamed ML. Prevalence and associations of 25-hydroxyvitamin D deficiency in US children: NHANES 2001–2004. Pediatrics. 2009;124(3):e362-e70.
64. Bierschenk L, Alexander J, Wasserfall C, Haller M, Schatz D, Atkinson M. Vitamin D

levels in subjects with and without type 1 diabetes residing in a solar rich environment. Diabetes Care. 2009;32(11):1977-9.

65. Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, Hoffman M, Eisenbarth GS, Erlich HA, et al. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. Jama. 2003;290(13):1713-20.

66. Virtanen S, Hyppönen E, Läärä E, Vähäsalo P, Kulmala P, Savola K, et al. Cow's milk consumption, disease–associated autoantibodies and Type 1 diabetes mellitus: a follow–up study in siblings of diabetic children. Diabetic medicine. 1998;15(9):730-8.

67. Bodington M, McNally P, Burden A. Cow's milk and type 1 childhood diabetes: no increase in risk. Diabetic medicine. 1994;11(7):663-5.

68. Mayer EJ, Hamman RF, Gay EC, Lezotte DC, Savitz DA, Klingensmith GJ. Reduced risk of IDDM among breast-fed children: the Colorado IDDM Registry. Diabetes. 1988;37(12):1625-32.

69. Vaarala O, Knip M, Paronen J, Hämäläinen A-M, Muona P, Väätäinen M, et al. Cow's milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infants at genetic risk for type 1 diabetes. Diabetes. 1999;48(7):1389-94.

70. Ziegler A-G, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes–associated autoantibodies. Jama. 2003;290(13):1721-8.

71. Virtanen SM, Kenward MG, Erkkola M, Kautiainen S, Kronberg-Kippilä C, Hakulinen T, et al. Age at introduction of new foods and advanced beta cell autoimmunity in young children with HLA-conferred susceptibility to type 1 diabetes. Diabetologia. 2006;49(7):1512-21.

72. Hyppönen E, Läärä E, Reunanen A, Järvelin M-R, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. The Lancet. 2001;358(9292):1500-3.

73. Fronczak CM, Barón AE, Chase HP, Ross C, Brady HL, Hoffman M, et al. In utero dietary exposures and risk of islet autoimmunity in children. Diabetes care. 2003;26(12):3237-42.

74. Knekt P, Reunanen A, Marniemi J, Leino A, Aromaa A. Low vitamin E status is a potential risk factor for insulin–dependent diabetes mellitus. Journal of internal medicine. 1999;245(1):99-102.

75. Melmed S. Williams textbook of endocrinology: Elsevier Health Sciences; 2016.

76. Group DPTTDS. Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. New England Journal of Medicine. 2002;346(22):1685-91.

77. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Chase HP, et al. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. Diabetes. 1996;45(7):926-33.
78. Silverstein J, Klingensmith G, Copeland K, Plotnick L, Kaufman F, Laffel L, et al. Care of children and adolescents with type 1 diabetes a statement of the American Diabetes Association. Diabetes care. 2005;28(1):186-212.
79. Control D, Group CTR. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl j Med. 1993;1993(329):977-86.
80. Danne T, Mortensen HB, Hougaard P, Lynggaard H, Aanstoot H-J, Chiarelli F, et al. Persistent differences among centers over 3 years in glycemic control and hypoglycemia in a study of 3,805 children and adolescents with type 1 diabetes from the Hvidøre Study Group. Diabetes Care. 2001;24(8):1342-7.
81. Petitti DB, Klingensmith GJ, Bell RA, Andrews JS, Dabelea D, Imperatore G, et al. Glycemic control in youth with diabetes: the SEARCH for diabetes in Youth Study. The Journal of pediatrics. 2009;155(5):668-72. e3.
82. Maahs DM, Horton LA, Chase HP. The use of insulin pumps in youth with type 1 diabetes. Diabetes technology & therapeutics. 2010;12(S1):S-59-S-65.
83. Chase HP, Gaston J, Messer L. Understanding Insulin Pumps & Continuous Glucose Monitors: Children's Diabetes Foundation at Denver; 2007.
84. Group JDRFCGMS. The effect of continuous glucose monitoring in well-controlled type 1 diabetes. Diabetes Care. 2009;32(8):1378-83.
85. Eckel RH, Barouch WW, Ershow AG. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on the pathophysiology of obesity-associated cardiovascular disease. Circulation. 2002;105(24):2923-8.
86. Nathan D, Cleary P, Backlund J, Genuth S, Lachin J, Orchard T, et al. Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. N Engl J Med. 2005;353(25):2643-53.
87. Saudek CD, Derr RL, Kalyani RR. Assessing glycemia in diabetes using self-monitoring blood glucose and hemoglobin A1c. Jama. 2006;295(14):1688-97.
88. McElduff A, Cheung NW, McIntyre HD, Lagstrom JA, Oats JJ, Ross GP, et al. The Australasian Diabetes in Pregnancy Society consensus guidelines for the management of type

1 and type 2 diabetes in relation to pregnancy. Medical journal of Australia. 2005;183(7):373.
89. Kavey R-EW, Allada V, Daniels SR, Hayman LL, McCrindle BW, Newburger JW, et al. Cardiovascular Risk Reduction in High-Risk Pediatric Patients A Scientific Statement From the American Heart Association Expert Panel on Population and Prevention Science; the Councils on Cardiovascular Disease in the Young, Epidemiology and Prevention, Nutrition, Physical Activity and Metabolism, High Blood Pressure Research, Cardiovascular Nursing, and the Kidney in Heart Disease; and the Interdisciplinary Working Group on Quality of Care and Outcomes Research: Endorsed by the American Academy of Pediatrics. Circulation. 2006;114(24):2710-38.
90. Maahs DM, Kinney GL, Wadwa P, Snell-Bergeon JK, Dabelea D, Hokanson J, et al. Hypertension prevalence, awareness, treatment, and control in an adult type 1 diabetes population and a comparable general population. Diabetes Care. 2005;28(2):301-6.
91. Patterson C, Dahlquist G, Harjutsalo V, Joner G, Feltbower R, Svensson J, et al. Early mortality in EURODIAB population-based cohorts of type 1 diabetes diagnosed in childhood since 1989. Diabetologia. 2007;50(12):2439-42.
92. Bach J-F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. New England journal of medicine. 2002;347(12):911-20.
93. Platts-Mills TA. The allergy epidemics: 1870-2010. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2015;136(1):3-13.
94. Prescott SL, Pawankar R, Allen KJ, Campbell DE, Sinn JK, Fiocchi A, et al. A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. World Allergy Organization Journal. 2013;6(1):1.
95. Yensen J, Naylor S. The complementary iceberg tips of diabetes and precision medicine. J Precision Med. 2016;3:21-39.
96. Burisch J, Pedersen N, Čuković-Čavka S, Brinar M, Kaimakliotis I, Duricova D, et al. East–west gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCO-EpiCom inception cohort. Gut. 2013:gutjnl-2013-304636.
97. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. BMJ: British Medical Journal. 1989;299(6710):1259.
98. Matricardi P, Bonini S. High microbial turnover rate preventing atopy: a solution to inconsistencies impinging on the Hygiene hypothesis? Clinical & Experimental Allergy. 2000;30(11):1506-10.
99. Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, Van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. Science. 2002;296(5567):490-4.

100. Benn CS, Melbye M, Wohlfahrt J, Björkstén B, Aaby P. Cohort study of sibling effect, infectious diseases, and risk of atopic dermatitis during first 18 months of life. Bmj. 2004;328(7450):1223.
101. Rook GA, Martinelli R, Brunet LR. Innate immune responses to mycobacteria and the downregulation of atopic responses. Current opinion in allergy and clinical immunology. 2003;3(5):337-42.
102. Romano-Keeler J, Weitkamp J-H. Maternal influences on fetal microbial colonization and immune development. Pediatric research. 2014;77(1-2):189.
103. Vatanen T, Kostic AD, d'Hennezel E, Siljander H, Franzosa EA, Yassour M, et al. Variation in microbiome LPS immunogenicity contributes to autoimmunity in humans. Cell. 2016;165(4):842-53.
104. Katsnelson A. Core Concept: Prebiotics gain prominence but remain poorly defined. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016;113(50):14168-9.
105. Bloomfield SF, Rook GA, Scott EA, Shanahan F, Stanwell-Smith R, Turner P. Time to abandon the hygiene hypothesis: new perspectives on allergic disease, the human microbiome, infectious disease prevention and the role of targeted hygiene. Perspectives in public health. 2016;136(4):213-24.
106. Helmby H. Human helminth therapy to treat inflammatory disorders-where do we stand? BMC immunology. 2015;16(1):12.
107. West CE, Hammarström ML, Hernell O. Probiotics in primary prevention of allergic disease–follow‐up at 8–9 years of age. Allergy. 2013;68(8):1015-20.
108. Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, Amir A, Gonzalez A, et al. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. Nature medicine. 2016;22(3):250.
109. Group NDD. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. Diabetes. 1979;28(12):1039-57.
110. Gale EA. The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. Diabetes. 2002;51(12):3353-61.
111. Willcox A, Richardson S, Bone A, Foulis A, Morgan N. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. Clinical & Experimental Immunology. 2009;155(2):173-81.
112. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulitis and β-cell loss in type 1 diabetes. Nature Reviews Endocrinology. 2009;5(4):219-26.
113. Roep BO, Atkinson M, von Herrath M. Satisfaction (not) guaranteed: re-evaluating the use of animal models of type 1 diabetes. Nature Reviews Immunology. 2004;4(12):989-97.

114. Lecompte PM. Insulitis in early juvenile diabetes. AMA archives of pathology. 1958;66(4):450.
115. Schmidt M. Über die Beziehung der Langerhansschen Inseln des Pankreas zum Diabetes mellitus. Münch Med Wochenschr. 1902;49:51-4.
116. Von Meyenburg H. Ueber «insulitis» bei diabetes. Schweiz Med Wochenschr. 1940;21:554.
117. STANSFIELD OH, WARREN S. Inflammation involving the islands of Langerhans in diabetes. New England Journal of Medicine. 1928;198(13):686-7.
118. Gepts W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. Diabetes. 1965;14(10):619-33.
119. Gepts W, De Mey J. Islet Cell Survival Determined by Morphology An Immunocytochemical Study of the Islets of Langerhans in Juvenile Diabetes Mellitus. Diabetes. 1978;27(Supplement 1):251-61.
120. Doniach I, Morgan A. Islets of Langerhans in juvenile diabetes mellitus. Clinical endocrinology. 1973;2(3):233-48.
121. Keenan HA, Sun JK, Levine J, Doria A, Aiello LP, Eisenbarth G, et al. Residual insulin production and pancreatic β-cell turnover after 50 years of diabetes: Joslin Medalist Study. Diabetes. 2010;59(11):2846-53.
122. Gianani R, Campbell-Thompson M, Sarkar S, Wasserfall C, Pugliese A, Solis J, et al. Dimorphic histopathology of long-standing childhood-onset diabetes. Diabetologia. 2010;53(4):690-8.
123. Meier J, Bhushan A, Butler A, Rizza R, Butler P. Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? Diabetologia. 2005;48(11):2221-8.
124. Ardiles A, Ewer J, Acosta ML, Kirkwood A, Martinez A, Ebensperger L, et al. Octodon degus (Molina 1782): a model in comparative biology and biomedicine. Cold Spring Harbor protocols2013. p. 312.
125. Van der Werf N, Kroese FG, Rozing J, Hillebrands JL. Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. Diabetes/metabolism research and reviews. 2007;23(3):169-83.
126. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. The Lancet. 2001;358(9277):221-9.
127. Chujo D, Foucat E, Nguyen T-S, Chaussabel D, Banchereau J, Ueno H. ZnT8-Specific CD4+ T cells display distinct cytokine expression profiles between type 1 diabetes patients and healthy adults. PloS one. 2013;8(2):e55595.

128. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. Endocrinology and Metabolism Clinics. 2010;39(3):481-97.
129. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, et al. Divergent pro-and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. Journal of Experimental Medicine. 2003;198(12):1951-7.
130. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nature immunology. 2005;6(11):1123.
131. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23–IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. Nature Reviews Immunology. 2014;14(9):585.
132. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature. 2003;421(6924):744.
133. Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, et al. Induction and molecular signature of pathogenic T H 17 cells. Nature immunology. 2012;13(10):991.
134. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor RORγt directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. Cell. 2006;126(6):1121-33.
135. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. Annual review of immunology. 2009;27:485-517.
136. Gu C, Wu L, Li X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. Cytokine. 2013;64(2):477-85.
137. Martin－Orozco N, Chung Y, Chang SH, Wang YH, Dong C. Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. European journal of immunology. 2009;39(1):216-24.
138. Jain R, Tartar DM, Gregg RK, Divekar RD, Bell JJ, Lee H-H, et al. Innocuous IFNγ induced by adjuvant-free antigen restores normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production. Journal of Experimental Medicine. 2008;205(1):207-18.
139. Kuriya G, Uchida T, Akazawa S, Kobayashi M, Nakamura K, Satoh T, et al. Double deficiency in IL-17 and IFN-γ signalling significantly suppresses the development of diabetes in the NOD mouse. Diabetologia. 2013;56(8):1773-80.
140. Tong Z, Liu W, Yan H, Dong C. Interleukin－17A deficiency ameliorates streptozotocin－induced diabetes. Immunology. 2015;146(2):339-46.

141. Honkanen J, Nieminen JK, Gao R, Luopajarvi K, Salo HM, Ilonen J, et al. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. The Journal of Immunology. 2010;185(3):1959-67.
142. Arif S, Moore F, Marks K, Bouckenooghe T, Dayan CM, Planas R, et al. Peripheral and islet interleukin-17 pathway activation characterizes human autoimmune diabetes and promotes cytokine-mediated β-cell death. Diabetes. 2011;60(8):2112-9.
143. Bradshaw EM, Raddassi K, Elyaman W, Orban T, Gottlieb PA, Kent SC, et al. Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. The Journal of Immunology. 2009;183(7):4432-9.
144. Ferraro A, Socci C, Stabilini A, Valle A, Monti P, Piemonti L, et al. Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. Diabetes. 2011;60(11):2903-13.
145. Marwaha AK, Crome SQ, Panagiotopoulos C, Berg KB, Qin H, Ouyang Q, et al. Cutting edge: increased Il-17–secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes. The Journal of Immunology. 2010;185(7):3814-8.
146. Ryba-Stanisławowska M, Skrzypkowska M, Myśliwska J, Myśliwiec M. The serum IL-6 profile and Treg/Th17 peripheral cell populations in patients with type 1 diabetes. Mediators of inflammation. 2013;2013.
147. Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, et al. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. Science. 2009;326(5955):986-91.
148. Ichiyama K, Yoshida H, Wakabayashi Y, Chinen T, Saeki K, Nakaya M, et al. Foxp3 inhibits RORγt-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORγt. Journal of Biological Chemistry. 2008;283(25):17003-8.
149. Emamaullee JA, Davis J, Merani S, Toso C, Elliott JF, Thiesen A, et al. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. Diabetes. 2009;58(6):1302-11.
150. Nikoopour E, Singh B. Reciprocity in microbiome and immune system interactions and its implications in disease and health. Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy). 2014;13(2):94-104.
151. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. Cell. 2006;124(4):837-48.
152. Vaarala O, Atkinson MA, Neu J. The "perfect storm" for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. Diabetes. 2008;57(10):2555-62.
153. Ivanov II, de Llanos Frutos R, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, et al.

Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. Cell host & microbe. 2008;4(4):337-49.

154. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. Cell. 2009;139(3):485-98.

155. Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lécuyer E, Mulder I, Lan A, Bridonneau C, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. Immunity. 2009;31(4):677-89.

156. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, Liu H, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. Nature. 2013;504(7480):451.

157. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-y M, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. Science. 2013:1237242.

158. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. Nature. 2013;504(7480):446.

159. Candon S, Perez-Arroyo A, Marquet C, Valette F, Foray A-P, Pelletier B, et al. Antibiotics in early life alter the gut microbiome and increase disease incidence in a spontaneous mouse model of autoimmune insulin-dependent diabetes. PloS one. 2015;10(5):e0125448.

160. Lau K, Benitez P, Ardissone A, Wilson TD, Collins EL, Lorca G, et al. Inhibition of type 1 diabetes correlated to a Lactobacillus johnsonii N6. 2-mediated Th17 bias. The Journal of Immunology. 2011;186(6):3538-46.

161. Kriegel MA, Sefik E, Hill JA, Wu H-J, Benoist C, Mathis D. Naturally transmitted segmented filamentous bacteria segregate with diabetes protection in nonobese diabetic mice. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011;108(28):11548-53.

162. Roesch LF, Lorca GL, Casella G, Giongo A, Naranjo A, Pionzio AM, et al. Culture-independent identification of gut bacteria correlated with the onset of diabetes in a rat model. The ISME journal. 2009;3(5):536.

163. Valladares R, Sankar D, Li N, Williams E, Lai K-K, Abdelgeliel AS, et al. Lactobacillus johnsonii N6. 2 mitigates the development of type 1 diabetes in BB-DP rats. Plos one. 2010;5(5):e10507.

164. Craig ME, Jefferies C, Dabelea D, Balde N, Seth A, Donaghue KC. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Definition, epidemiology, and classification of diabetes

in children and adolescents. Pediatric diabetes. 2014;15:4.
165. Solt LA, Banerjee S, Campbell S, Kamenecka TM, Burris TP. ROR inverse agonist suppresses insulitis and prevents hyperglycemia in a mouse model of type 1 diabetes. Endocrinology. 2015;156(3):869-81.
166. Wang X, Hao J, Metzger DL, Mui A, Ao Z, Akhoundsadegh N, et al. Early treatment of NOD mice with B7-H4 reduces the incidence of autoimmune diabetes. Diabetes. 2011;60(12):3246-55.
167. Kalim KW, Basler M, Kirk CJ, Groettrup M. Immunoproteasome subunit LMP7 deficiency and inhibition suppresses Th1 and Th17 but enhances regulatory T cell differentiation. The Journal of Immunology. 2012;189(8):4182-93.
168. Markle JG, Frank DN, Mortin-Toth S, Robertson CE, Feazel LM, Rolle-Kampczyk U, et al. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. Science. 2013;339(6123):1084-8.
169. Shi B, Wang Z, Jin H, Chen YW, Wang Q, Qian Y. Immunoregulatory Cordyceps sinensis increases regulatory T cells to Th17 cell ratio and delays diabetes in NOD mice. International immunopharmacology. 2009;9(5):582-6.
170. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. International immunology. 2009;21(4):317-37.
171. Lukic IK, Jelusic-Drazic M, Kovacic N, Grcevic D. Damage-associated molecular patterns-emerging targets for biologic therapy of childhood arthritides. Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy). 2009;8(2):139-45.
172. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. Nature. 2010;464(7285):104.
173. Sirisinha S. Insight into the mechanisms regulating immune homeostasis in health and disease. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology. 2011;29(1):1.
174. Youn JH, Shin J-S. Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. The Journal of Immunology. 2006;177(11):7889-97.
175. Bianchi ME, Manfredi AA. High–mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. Immunological reviews. 2007;220(1):35-46.
176. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, Tracey KJ, Vogl T, Feldmann M, et al. Alarmins: awaiting a clinical response. The Journal of clinical investigation. 2012;122(8):2711-9.

177. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. Journal of leukocyte biology. 2007;81(1):1-5.
178. Odink K, Cerletti N, Brüggen J, Clerc RG, Tarcsay L, Zwadlo G, et al. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. Nature. 1987;330(6143):80.
179. Wittkowski H, Hirono K, Ichida F, Vogl T, Ye F, Yanlin X, et al. Acute Kawasaki disease is associated with reverse regulation of soluble receptor for advance glycation end products and its proinflammatory ligand S100A12. Arthritis & Rheumatology. 2007;56(12):4174-81.
180. Zenz R, Eferl R, Kenner L, Florin L, Hummerich L, Mehic D, et al. Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. Nature. 2005;437(7057):369.
181. Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004;101(1):296-301.
182. Porto A, Palumbo R, Pieroni M, Aprigliano G, Chiesa R, Sanvito F, et al. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques secrete and proliferate in response to high mobility group box 1 protein. The FASEB Journal. 2006;20(14):2565-6.
183. Areschoug T, Gordon S. Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands. Trends in Innate Immunity. 15: Karger Publishers; 2008. p. 45-60.
184. Yang D, Tewary P, de la Rosa G, Wei F, Oppenheim JJ. The alarmin functions of high-mobility group proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms. 2010;1799(1):157-63.
185. Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey KJ, Bustin M, Oppenheim JJ. High mobility group box−1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. Journal of leukocyte biology. 2007;81(1):59-66.
186. Hammer HB, Ødegard S, Fagerhol MK, Landewé R, van der Heijde D, Uhlig T, et al. Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. Annals of the rheumatic diseases. 2007;66(8):1093-7.
187. Taylor PC, Feldmann M. Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis. Nature Reviews Rheumatology. 2009;5(10):nrrheum. 2009.181.
188. Reinhart K, Karzai W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. Critical care medicine. 2001;29(7):S121-S5.

189. Kaiser T, Langhorst J, Wittkowski H, Becker K, Friedrich AW, Rueffer A, et al. Faecal S100A12 as a non-invasive marker distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. Gut. 2007;56(12):1706-13.

190. Sundberg E, Grundtman C, af Klint E, Lindberg J, Ernestam S, Ulfgren A-K, et al. Systemic TNF blockade does not modulate synovial expression of the pro-inflammatory mediator HMGB1 in rheumatoid arthritis patients–a prospective clinical study. Arthritis research & therapy. 2008;10(2):R33.

191. Pullerits R, Jonsson M, Kollias G, Tarkowski A. Induction of arthritis by high mobility group box chromosomal protein 1 is independent of tumour necrosis factor signalling. Arthritis research & therapy. 2008;10(3):R72.

192. Kokkola R, Li J, Sundberg E, Aveberger AC, Palmblad K, Yang H, et al. Successful treatment of collagen – induced arthritis in mice and rats by targeting extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 activity. Arthritis & Rheumatology. 2003;48(7):2052-8.

193. Urbonaviciute V, Fürnrohr BG, Meister S, Munoz L, Heyder P, De Marchis F, et al. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1–nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. Journal of Experimental Medicine. 2008;205(13):3007-18.

194. Oppenheim JJ, Tewary P, de la Rosa G, Yang D. Alarmins initiate host defense. Immune-Mediated Diseases: Springer; 2007. p. 185-94.

195. Ferrari S, Finelli P, Rocchi M, Bianchi M. The active gene that encodes human high mobility group 1 protein (HMG1) contains introns and maps to chromosome 13. Genomics. 1996;35(2):367-71.

196. Kornblit B, Munthe – Fog L, Petersen S, Madsen H, Vindeløv L, Garred P. The genetic variation of the human HMGB1 gene. HLA. 2007;70(2):151-6.

197. Goodwin GH, Johns EW. The isolation and purification of the high mobility group (HMG) nonhistone chromosomal proteins. Methods in cell biology. 16: Elsevier; 1977. p. 257-67.

198. Ueda T, Chou H, Kawase T, Shirakawa H, Yoshida M. Acidic C-tail of HMGB1 is required for its target binding to nucleosome linker DNA and transcription stimulation. Biochemistry. 2004;43(30):9901-8.

199. Štros M, Štokrová J, Thomas JO. DNA looping by the HMG-box domains of HMG1 and modulation of DNA binding by the acidic C-terminal domain. Nucleic Acids Research.

1994;22(6):1044-51.
200. Read CM, Cary PD, Crane-Robinson C, Driscoll PC, Norman DG. Solution structure of a DNA-binding domain from HMG1. Nucleic Acids Research. 1993;21(15):3427-36.
201. Saito K, Kikuchi T, Yoshida M. The mechanism of sequence non-specific DNA binding of HMG1/2-box B in HMG1 with DNA. Protein engineering. 1999;12(3):235-42.
202. Uramoto H, Izumi H, Nagatani G, Ohmori H, Nagasue N, Tomoko I, et al. Physical interaction of tumour suppressor p53/p73 with CCAAT-binding transcription factor 2 (CTF2) and differential regulation of human high-mobility group 1 (HMG1) gene expression. Biochemical Journal. 2003;371(2):301-10.
203. Pogna EA, Clayton AL, Mahadevan LC. Signalling to chromatin through post-translational modifications of HMGN. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms. 2010;1799(1):93-100.
204. Ito I, Fukazawa J, Yoshida M. Post-translational methylation of high mobility group box 1 (HMGB1) causes its cytoplasmic localization in neutrophils. Journal of Biological Chemistry. 2007;282(22):16336-44.
205. MOSEVITSKY MI, NOVITSKAYA VA, IOGANNSEN MG, ZABEZHINSKY MA. Tissue specificity of nucleo – cytoplasmic distribution of HMG1 and HMG2 proteins and their probable functions. The FEBS Journal. 1989;185(2):303-10.
206. Müller S, Ronfani L, Bianchi M. Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. Journal of internal medicine. 2004;255(3):332-43.
207. Geroldi D, Falcone C, Emanuele E. Soluble receptor for advanced glycation end products: from disease marker to potential therapeutic target. Current medicinal chemistry. 2006;13(17):1971-8.
208. Campana L, Bosurgi L, Rovere-Querini P. HMGB1: a two-headed signal regulating tumor progression and immunity. Current opinion in immunology. 2008;20(5):518-23.
209. Martens H, Nienhuis H, Gross S, der Steege Gv, Brouwer E, Berden J, et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus and disease severity in lupus nephritis. Lupus. 2012;21(9):959-68.
210. Foell D, Ichida F, Vogl T, Yu X, Chen R, Miyawaki T, et al. S100A12 (EN-RAGE) in monitoring Kawasaki disease. The Lancet. 2003;361(9365):1270-2.
211. Štros M. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms. 2010;1799(1):101-13.
212. Štros M, Polanska E, Štruncová S, Pospíšilová Š. HMGB1 and HMGB2 proteins up-

regulate cellular expression of human topoisomerase IIα. Nucleic acids research. 2009;37(7):2070-86.

213. Bonaldi T, Längst G, Strohner R, Becker PB, Bianchi ME. The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC – dependent nucleosome sliding. The EMBO journal. 2002;21(24):6865-73.

214. Jayaraman L, Moorthy NC, Murthy KG, Manley JL, Bustin M, Prives C. High mobility group protein-1 (HMG-1) is a unique activator of p53. Genes & development. 1998;12(4):462-72.

215. Štros M, Ozaki T, Bačíková A, Kageyama H, Nakagawara A. HMGB1 and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53-and p73-dependent sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter. Journal of Biological Chemistry. 2002;277(9):7157-64.

216. Lv B, Wang H, Tang Y, Fan Z, Chen F, Xiao X. High mobility group box 1 protein induces tissue factor expression in vascular endothelial cells via activation of NF-κB and Egr-1. Thrombosis and haemostasis. 2009;102(2):352.

217. Moggs JG, Szymkowski DE, Yamada M, Karran P, Wood RD. Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin-DNA adducts. Nucleic acids research. 1997;25(3):480-90.

218. Liu Y, Prasad R, Wilson SH. HMGB1: roles in base excision repair and related function. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms. 2010;1799(1):119-30.

219. Tang D, Kang R, Van Houten B, Zeh HJ, Billiar TR, Lotze MT. High mobility group box 1 (HMGB1) phenotypic role revealed with stress. Molecular Medicine. 2014;20(1):359.

220. Zhu X, Messer JS, Wang Y, Lin F, Cham CM, Chang J, et al. Cytosolic HMGB1 controls the cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation. The Journal of clinical investigation. 2015;125(3):1098-110.

221. Ditsworth D, Zong W-X, Thompson CB. Activation of poly (ADP)-ribose polymerase (PARP-1) induces release of the pro-inflammatory mediator HMGB1 from the nucleus. Journal of Biological Chemistry. 2007;282(24):17845-54.

222. Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, et al. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. The EMBO journal. 2003;22(20):5551-60.

223. Kang R, Zhang Q, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. HMGB1 in cancer: good, bad, or both? Clinical cancer research. 2013;19(15):4046-57.

224. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic

cells triggers inflammation. Nature. 2002;418(6894):191.
225. Bell CW, Jiang W, Reich III CF, Pisetsky DS. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2006;291(6):C1318-C25.
226. Hamada T, Torikai M, Kuwazuru A, Tanaka M, Horai N, Fukuda T, et al. Extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 is a coupling factor for hypoxia and inflammation in arthritis. Arthritis & Rheumatology. 2008;58(9):2675-85.
227. Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non–classical, vesicle–mediated secretory pathway. EMBO reports. 2002;3(10):995-1001.
228. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science. 1999;285(5425):248-51.
229. Thorburn J, Horita H, Redzic J, Hansen K, Frankel AE, Thorburn A. Autophagy regulates selective HMGB1 release in tumor cells that are destined to die. Cell death and differentiation. 2009;16(1):175.
230. Tang D, Kang R, Cheh C-W, Livesey KM, Liang X, Schapiro NE, et al. HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. Oncogene. 2010;29(38):5299.
231. Kazama H, Ricci J-E, Herndon JM, Hoppe G, Green DR, Ferguson TA. Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. Immunity. 2008;29(1):21-32.
232. Qin S, Wang H, Yuan R, Li H, Ochani M, Ochani K, et al. Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. Journal of Experimental Medicine. 2006;203(7):1637-42.
233. Dumitriu IE, Baruah P, Valentinis B, Voll RE, Herrmann M, Nawroth PP, et al. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. The Journal of Immunology. 2005;174(12):7506-15.
234. Tsung A, Klune JR, Zhang X, Jeyabalan G, Cao Z, Peng X, et al. HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4–dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling. Journal of Experimental Medicine. 2007;204(12):2913-23.
235. Gong H, Zuliani P, Komuravelli A, Faeder JR, Clarke EM, editors. Analysis and verification of the HMGB1 signaling pathway. BMC bioinformatics; 2010: BioMed Central.
236. Manfredi AA, Capobianco A, Esposito A, De Cobelli F, Canu T, Monno A, et al. Maturing dendritic cells depend on RAGE for in vivo homing to lymph nodes. The Journal of

Immunology. 2008;180(4):2270-5.
237. Tian J, Avalos AM, Mao S-Y, Chen B, Senthil K, Wu H, et al. Toll-like receptor 9–dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. Nature immunology. 2007;8(5):487.
238. Ivanov S, Dragoi A-M, Wang X, Dallacosta C, Louten J, Musco G, et al. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. Blood. 2007;110(6):1970-81.
239. Jiang W, Bell CW, Pisetsky DS. The relationship between apoptosis and high-mobility group protein 1 release from murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide or polyinosinic-polycytidylic acid. The Journal of Immunology. 2007;178(10):6495-503.
240. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger A-C, Bloom O, Erlandsson-Harris H, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. Journal of Experimental Medicine. 2000;192(4):565-70.
241. Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Wilkman E, Pakkanen J, Stenfors J, Tuominen RK, et al. Regulation of monocyte migration by amphoterin (HMGB1). Blood. 2004;104(4):1174-82.
242. Rendon-Mitchell B, Ochani M, Li J, Han J, Wang H, Yang H, et al. IFN-γ induces high mobility group box 1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism. The Journal of Immunology. 2003;170(7):3890-7.
243. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Criollo A, Ortiz C, Lidereau R, et al. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. Immunological reviews. 2007;220(1):47-59.
244. Youn JH, Oh YJ, Kim ES, Choi JE, Shin J-S. High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-α production in human monocytes. The Journal of Immunology. 2008;180(7):5067-74.
245. Liu Y, Yan W, Tohme S, Chen M, Fu Y, Tian D, et al. Hypoxia induced HMGB1 and mitochondrial DNA interactions mediate tumor growth in hepatocellular carcinoma through Toll-like receptor 9. Journal of hepatology. 2015;63(1):114-21.
246. Li X, Yue Y, Zhu Y, Xiong S. Extracellular, but not intracellular HMGB1, facilitates self-DNA induced macrophage activation via promoting DNA accumulation in endosomes and contributes to the pathogenesis of lupus nephritis. Molecular immunology. 2015;65(1):177-88.
247. Bianchi ME. HMGB1 loves company. Journal of leukocyte biology. 2009;86(3):573-6.
248. Urbonaviciute V, Fürnrohr BG, Weber C, Haslbeck M, Wilhelm S, Herrmann M, et al.

Factors masking HMGB1 in human serum and plasma. Journal of leukocyte biology. 2007;81(1):67-74.
249. Barnay-Verdier S, Gaillard C, Messmer M, Borde C, Gibot S, Maréchal V. PCA-ELISA: a sensitive method to quantify free and masked forms of HMGB1. Cytokine. 2011;55(1):4-7.
250. Gaillard C, Borde C, Gozlan J, Maréchal V, Strauss F. A high-sensitivity method for detection and measurement of HMGB1 protein concentration by high-affinity binding to DNA hemicatenanes. PLoS One. 2008;3(8):e2855.
251. Abdulahad DA, Westra J, Bijzet J, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M. High mobility group box 1 (HMGB1) and anti-HMGB1 antibodies and their relation to disease characteristics in systemic lupus erythematosus. Arthritis research & therapy. 2011;13(3):R71.
252. Sun W, Jiao Y, Cui B, Gao X, Xia Y, Zhao Y. Immune complexes activate human endothelium involving the cell-signaling HMGB1-RAGE axis in the pathogenesis of lupus vasculitis. Laboratory investigation. 2013;93(6):626.
253. Sirois CM, Jin T, Miller AL, Bertheloot D, Nakamura H, Horvath GL, et al. RAGE is a nucleic acid receptor that promotes inflammatory responses to DNA. Journal of Experimental Medicine. 2013;210(11):2447-63.
254. Kokkola R, Sundberg E, Ulfgren AK, Palmblad K, Li J, Wang H, et al. High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis. Arthritis & Rheumatology. 2002;46(10):2598-603.
255. Goldstein RS, Bruchfeld A, Yang L, Qureshi AR, Gallowitsch-Puerta M, Patel NB, et al. Cholinergic anti-inflammatory pathway activity and High Mobility Group Box-1 (HMGB1) serum levels in patients with rheumatoid arthritis. Molecular medicine. 2007;13(3-4):210.
256. Bruchfeld A, Wendt M, Bratt J, Qureshi AR, Chavan S, Tracey KJ, et al. High-mobility group box-1 protein (HMGB1) is increased in antineutrophilic cytoplasmatic antibody (ANCA)-associated vasculitis with renal manifestations. Molecular Medicine. 2011;17(1-2):29.
257. Ahn JK, Cha H-S, Bae E-K, Lee J, Koh E-M. Extracellular high-mobility group box 1 is increased in patients with Behcet's disease with intestinal involvement. Journal of Korean medical science. 2011;26(5):697-700.
258. Takahata R, Ono S, Tsujimoto H, Hiraki S, Kimura A, Kinoshita M, et al. Postoperative serum concentrations of high mobility group box chromosomal protein-1 correlates to the duration of SIRS and pulmonary dysfunction following gastrointestinal

surgery. Journal of Surgical Research. 2011;170(1):e135-e40.
259. Cohen MJ, Brohi K, Calfee CS, Rahn P, Chesebro BB, Christiaans SC, et al. Early release of high mobility group box nuclear protein 1 after severe trauma in humans: role of injury severity and tissue hypoperfusion. Critical care. 2009;13(6):R174.
260. Wang X-W, Karki A, Du D-Y, Zhao X-J, Xiang X-Y, Lu Z-Q. Plasma levels of high mobility group box 1 increase in patients with posttraumatic stress disorder after severe blunt chest trauma: a prospective cohort study. journal of surgical research. 2015;193(1):308-15.
261. Lantos J, Földi V, Róth E, Wéber G, Bogár L, Csontos C. Burn trauma induces early HMGB1 release in patients: its correlation with cytokines. Shock. 2010;33(6):562-7.
262. Abraham E. Unraveling the role of high mobility group box protein 1 in severe trauma. Critical Care. 2009;13(6):1004.
263. Rink L, Haase H. Zinc homeostasis and immunity. Trends in immunology. 2007;28(1):1-4.
264. Ibs K-H, Rink L. Zinc-altered immune function. The Journal of nutrition. 2003;133(5):1452S-6S.
265. Jansen J, Karges W, Rink L. Zinc and diabetes—clinical links and molecular mechanisms. The Journal of nutritional biochemistry. 2009;20(6):399-417.
266. Fraker PJ, King LE. Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. Annu Rev Nutr. 2004;24:277-98.
267. Kelleher SL, McCormick NH, Velasquez V, Lopez V. Zinc in specialized secretory tissues: roles in the pancreas, prostate, and mammary gland. Advances in nutrition. 2011;2(2):101-11.
268. Reinhold D, Ansorge S, Grüngreiff K. Immunobiology of zinc and zinc therapy. Immunology today. 1999;20(2):102.
269. Jansen J, Rosenkranz E, Overbeck S, Warmuth S, Mocchegiani E, Giacconi R, et al. Disturbed zinc homeostasis in diabetic patients by in vitro and in vivo analysis of insulinomimetic activity of zinc. The Journal of nutritional biochemistry. 2012;23(11):1458-66.
270. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. Nature Reviews Immunology. 2007;7(1):19.
271. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. Annual review of immunology. 2003;21(1):685-711.
272. Prasad AS. Zinc and immunity. Molecular and cellular biochemistry. 1998;188(1-2):63-9.

273. Hirano T, Murakami M, Fukada T, Nishida K, Yamasaki S, Suzuki T. Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule. Advances in immunology. 2008;97:149-76.
274. Bao S, Liu M-J, Lee B, Besecker B, Lai J-P, Guttridge DC, et al. Zinc modulates the innate immune response in vivo to polymicrobial sepsis through regulation of NF-κB. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 2010;298(6):L744-L54.
275. Stafford SL, Bokil NJ, Achard ME, Kapetanovic R, Schembri MA, McEWAN AG, et al. Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. Portland Press Limited; 2013.
276. Tan JK, O'Neill HC. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. Journal of leukocyte biology. 2005;78(2):319-24.
277. Kitamura H, Morikawa H, Kamon H, Iguchi M, Hojyo S, Fukada T, et al. Toll-like receptor–mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function. Nature immunology. 2006;7(9):971.
278. Uzzo RG, Crispen PL, Golovine K, Makhov P, Horwitz EM, Kolenko VM. Diverse effects of zinc on NF-κB and AP-1 transcription factors: implications for prostate cancer progression. Carcinogenesis. 2006;27(10):1980-90.
279. Tucci M, Stucci S, Strippoli S, Silvestris F. Cytokine overproduction, T-cell activation, and defective T-regulatory functions promote nephritis in systemic lupus erythematosus. BioMed Research International. 2010;2010.
280. Knoell DL, Julian MW, Bao S, Besecker B, Macre JE, Leikauf GD, et al. Zinc deficiency increases organ damage and mortality in a murine model of polymicrobial sepsis. Critical care medicine. 2009;37(4):1380.
281. Rosenkranz E, Metz CH, Maywald M, Hilgers RD, Weßels I, Senff T, et al. Zinc supplementation induces regulatory T cells by inhibition of Sirt − 1 deacetylase in mixed lymphocyte cultures. Molecular nutrition & food research. 2016;60(3):661-71.
282. Kitabayashi C, Fukada T, Kanamoto M, Ohashi W, Hojyo S, Atsumi T, et al. Zinc suppresses Th17 development via inhibition of STAT3 activation. International immunology. 2010;22(5):375-86.
283. Rosenkranz E, Hilgers R-D, Uciechowski P, Petersen A, Plümäkers B, Rink L. Zinc enhances the number of regulatory T cells in allergen-stimulated cells from atopic subjects. European journal of nutrition. 2017;56(2):557-67.
284. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, et al. Gene-

microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. Nature medicine. 2002;8(5):500.

285. Van Dam RM, Hu FB, Rosenberg L, Krishnan S, Palmer JR. Dietary calcium and magnesium, major food sources, and risk of type 2 diabetes in US black women. Diabetes care. 2006;29(10):2238-43.

286. Rude RK. Physiology of magnesium metabolism and the important role of magnesium in potassium deficiency. The American journal of cardiology. 1989;63(14):G31-G4.

287. Zargar AH, Bashir MI, Masoodi SR, Laway BA, Wani AI, Khan AR, et al. Copper, zinc and magnesium levels in type-1 diabetes mellitus. Saudi medical journal. 2002;23(5):539-42.

288. Paolisso G, Scheen A, d'Onofrio F, Lefebvre P. Magnesium and glucose homeostasis. Diabetologia. 1990;33(9):511-4.

289. Sugimoto J, Romani AM, Valentin-Torres AM, Luciano AA, Kitchen CMR, Funderburg N, et al. Magnesium decreases inflammatory cytokine production: a novel innate immunomodulatory mechanism. The Journal of Immunology. 2012;188(12):6338-46.

290. Phillips CM, Perry IJ. Does inflammation determine metabolic health status in obese and nonobese adults? The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2013;98(10):E1610-E9.

291. Park HS, Park JY, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-α and IL-6. Diabetes research and clinical practice. 2005;69(1):29-35.

292. Simões AFR. Níveis séricos de proteína C reactiva e perfil lipídico numa população de crianças e adolescentes com Diabetes Mellitus tipo 1: trabalho de investigação: C-reactive protein and lipid levels in young subjects with type 1 diabetes mellitus. 2008.

293. Giacconi R, Cai L, Costarelli L, Cardelli M, Malavolta M, Piacenza F, et al. Implications of impaired zinc homeostasis in diabetic cardiomyopathy and nephropathy. BioFactors. 2017;43(6):770-84.

294. Skalnaya MG, Skalny AV, Yurasov VV, Demidov VA, Grabeklis AR, Radysh IV, et al. Serum Trace Elements and Electrolytes Are Associated with Fasting Plasma Glucose and HbA 1c in Postmenopausal Women with Type 2 Diabetes Mellitus. Biological trace element research. 2017;177(1):25-32.

295. de Carvalho GB, Brandão-Lima PN, Maia CSC, Barbosa KBF, Pires LV. Zinc's role in the glycemic control of patients with type 2 diabetes: a systematic review. Biometals. 2017;30(2):151-62.

296. Niechciał E, Rogowicz-Frontczak A, Piłaciński S, Fichna M, Skowrońska B, Fichna P, et al. Autoantibodies against zinc transporter 8 are related to age and metabolic state in patients with newly diagnosed autoimmune diabetes. Acta diabetologica. 2018;55(3):287-94.
297. Alghobashy AA, Alkholy UM, Talat MA, Abdalmonem N, Zaki A, Ahmed IA, et al. Trace elements and oxidative stress in children with type 1 diabetes mellitus. Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy. 2018;11:85.
298. Sugimoto J, Romani AM, Valentin-Torres AM, Luciano AA, Kitchen CMR, Funderburg N, et al. Magnesium decreases inflammatory cytokine production: a novel innate immunomodulatory mechanism. The Journal of Immunology. 2012:1101765.
299. Ozcaliskan Ilkay H, Sahin H, Tanriverdi F, Samur G. Association Between Magnesium Status, Dietary Magnesium Intake, and Metabolic Control in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. Journal of the American College of Nutrition. 2018:1-8.
300. Claverie-Martin F. Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: clinical and molecular characteristics. Clinical kidney journal. 2015;8(6):656-64.
301. Pachydaki SI, Tari SR, Lee SE, Ma W, Tseng JJ, Sosunov AA, et al. Upregulation of RAGE and its ligands in proliferative retinal disease. Experimental eye research. 2006;82(5):807-15.
302. Hagiwara S, Iwasaka H, Hasegawa A, Koga H, Noguchi T. Effects of hyperglycemia and insulin therapy on high mobility group box 1 in endotoxin-induced acute lung injury in a rat model. Critical care medicine. 2008;36(8):2407-13.
303. Tsoyi K, Jang HJ, Nizamutdinova IT, Kim YM, Lee YS, Kim HJ, et al. Metformin inhibits HMGB1 release in LPS – treated RAW 264.7 cells and increases survival rate of endotoxaemic mice. British journal of pharmacology. 2011;162(7):1498-508.
304. Arrigo T, Chirico V, Salpietro V, Munafò C, Ferraù V, Gitto E, et al. High-mobility group protein B1 (HMGB1): a new biomarker of metabolic syndrome in obese children. European journal of endocrinology. 2013:EJE-13-0037.
305. Kanellakis P, Agrotis A, Kyaw TS, Koulis C, Ahrens I, Mori S, et al. High-mobility group box protein 1 neutralization reduces development of diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein E–deficient mice. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2011;31(2):313-9.
306. Hashimoto T, Ishii J, Kitagawa F, Yamada S, Hattori K, Okumura M, et al. Circulating high-mobility group box 1 and cardiovascular mortality in unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. Atherosclerosis. 2012;221(2):490-5.

307. Kim J, Sohn E, Kim C-S, Jo K, Kim JS. The role of high-mobility group box-1 protein in the development of diabetic nephropathy. American journal of nephrology. 2011;33(6):524-9.
308. Wittkowski H, Hirono K, Ichida F, Vogl T, Ye F, Yanlin X, et al. Acute Kawasaki disease is associated with reverse regulation of soluble receptor for advance glycation end products and its proinflammatory ligand S100A12. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology. 2007;56(12):4174-81.
309. Boutens L, Stienstra R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. Diabetologia. 2016;59(5):879-94.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI:

Ime i prezime: Igor Marjanac

Datum i mjesto roĐenja: 30. srpnja 1964. g., Osijek

Adresa: Sjenjak 89, 31 000 Osijek

Telefon: 031/ 571 554

Mobitel: 098/9005527

OBRAZOVANJE:

ožujak 1993.g. – diplomirao na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

rujan 2000. g. – specijalist pedijatar

svibanj 2017. g. – subspecijalist pedijatrijske endokrinologije

AKADEMSKI NASLOV:

1993. – doktor medicine

DOSADAŠNJA RADNA MJESTA:

1993. – 1995. – liječnik pripravnik u Kliničkoj bolnici Osijek

1995. – 2000. – specijalizant na Klinici za pedijatriju Kliničke bolnice Osijek

Od 2000. – liječnik na Odjelu za endokrinologiju i bolesti metabolizma Klinike za pedijatriju KBC-a Osijek

ČLANSTVO U STRUČNIM DRUŠTVIMA:

1995. g. – Hrvatsko pedijatrijsko društvo
2013. – 2017. g. – član upravnog odbora HPD-a, predsjednik podružnice za Slavoniju
1996. g. – Hrvatsko društvo pedijatrijskih endokrinologa

INDEKSIRANI ČLANCI

1. Article: IL12RB2 Gene Is Associated with the Age of Type 1 Diabetes Onset in Croatian Family Trios. Marina Pehlić, Dina Vrkić, Veselin Skrabić, Ana Jerončić, Gordana Stipančić, Anita Špehar Urojić, Igor Marjanac, Jasminka Jakšić, Zrinka Kačić, Vesna Boraska, Tatijana Zemunik; PLoS ONE 01/2012; 7(11):e49133. • 4.09 Impact Factor

2. Rojnic Putarek N, Ille J, Spehar Uroic A, Skrabic V, Stipancic G, Krnic N, Radica A, Marjanac I, Severinski S, Svigir A, Bogdanic A, Dumic M: Incidence of type 1 diabetes mellitus in 0 to 14-yr.old children in Croatia - 2004 to 2012 study. Pediatric Diabetes 2014.

3. Lovrić R, Prlić N, Milutinović D, Marjanac I, Žvanut B. Changes in nursing students' expectations of nursing clinical faculties' competences: A longitudinal, mixed methods study. Nurse Educ Today. 2017;59:38-44. doi: 10.1016/j.nedt.2017.08.013.

4. Pehlic M, Stipancic G, Boraska V, Vrkic D, Skrabic V, Zemunik T, Urojic Spehar A, Marjanac I, Jaksic J, Kacic Z, Jeroncic A. Transmission disequilibrium analysis for IL12RB, ANXA11, VTCN1 and LPP gene SNPs in 265 family trios (T:U - copies of the minor allele transmitted (T) and untransmitted (U) from heterozygous parents to affected offspring). Figshare.

5. Pehlic M, Stipancic G, Boraska V, Vrkic D, Skrabic V, Zemunik T, Urojic Spehar A, Marjanac I, Jaksic J, Kacic Z, Jeroncic A. Quantitative transmission disequilibrium analysis (Abecasis’s orthogonal test) in 262 family trios with age of T1DM onset as a quantitative variable. Figshare.

ČASOPISI INDEKSIRANI U INDEX MEDICUS/EXCERPTA MEDICA

1. Miroslav Dumić; Nevena Janjanin; Anita Špehar Uroić; Jasenka Ille; Mate Škegro; Vesna Kušec; Igor Marjanac; Toni Matić; Dražen Jelašić – Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease As Cause Of Cushing's Syndrome Associated With Carney Complex, Lijec.Vjesn. 2006, Sep.- Oct, 128(9-10); 268-73.

RADOVI U NEINDEKSIRANIM PUBLIKACIJAMA

1. Marjanac, Igor; Pinotić, Ljerka; Fijačko, Mirjana. Učestalost pozitivnih antiglijadinskih i antiendomizijskih antitijela u djece oboljele od inzulin ovisnog dijabetesa melitusa// Paediatria Croatica/ Stoini, Eugenio ; Jakšić, Jasminka (ur.). Šibenik : Hrvatsko pedijatrijsko društvo, 2002. 109-109 (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).

2. Marjanac, Igor; Martina, Koričić; Silvija, Pušeljić; Sindrom Triple X – prikaz bolesnika. Pediatria Croatica, vol.56, suppl.2.2012.

3. Arambašić, Nikolina; Marjanac, Igor; Koričić, Martinas; Kasna neonatalna hipokalcemija uzrokovana tranzitornim neonatalnim hipoparatireoidizom – prikaz bolesnika; Paediatria Croatica, vo.56, suppl.2.2012.

4. Jović, Marijana; Katić, Martina; Aberle, Neda; Marjanac, Igor; Tomac, Višnja; Arambašić, Nikolina; Kardum, Darijan; Ivanković, Ines; Sarka, Jasna; Jurković, Vlatka; Josipović, Maja; Analiza stupnja uhranjenosti djece u srednjim školama na području grada Osijeka, Paediatria Croatica, vol.54, suppl.2.2010.

5. Jović, Marijana; Katić, Martina; Aberle, Neda; Marjanac, Igor; Tomac, Višnja; Kardum, Darijan; Ivanković, Ines; Arambašić, Nikolina; Sarka, Jasna; Jurković, Vlatka; Josipović, Maja; Analiza stupnja uhranjenosti sedmogodišnje djece na području grada Osijeka,

KONGRESNA PRIOPĆENJA – SAŽETCI

1. Berecki I, Pušeljić S, Marjanac I, Angebrandt S. «Cyber library» internet kao globalna medicinska stručna knjižnica. Simpozij pedijatara, Osijek 09. i 10. svibanj1997, Zbornik sažetaka (sažetak, stručni rad)

2. Marjanac, Igor; Pinotić, Ljerka; Hafner, Krasanka. Analiza izmijenjenog EEG-a u djece oboljele od dijabetesa melitusa ovisnog o inzulinu. // Neurologia Croatica. 52(2002) , suppl 2; 36, 88 (kongresno priopćenje, znanstveni).

3. Marjanac, Igor; Pinotić, Ljerka; Mesarić, Nataša. Celijakija u djece smanjenog rasta// Paediatria Croatica/ Ingeborg Barišić (ur.). Zagreb : Klinika za dječje bolesti, Zagreb, 2006. 52 (demonstracija,domaća recenzija,sažetak,stručni).

4. Pinotić, Ljerka; Pinotić, Krešo; Marjanac, Igor; Mesarić, Nataša. Atipična celijakija// Paediatria Croatica/ Ingeborg Barišić (ur.). Zagreb : Klinika za dječje bolesti, Zagreb, 2006. 47 (demonstracija,domaća recenzija,sažetak,stručni).

5. Baraban, Dunja, Marjanac, Igor. Psihologijski prisup kod djece s najčešćim somatizacijama// Zbornik sažetaka Tečaj trajnog usavršavanja iz pedijatrije - Osijek 2005/ Berecki, Igor (ur.). Osijek : Grafički studio, Čarolija, 2005. 15-19 (predavanje,sažetak,stručni).

6. Berecki, Igor; Marjanac, Igor; Mandić, Zlatko; Turjak, Nevenka. Ehokardiografska detekcija poremećaja fetalnog srčanog ritma// Knjiga sažetaka 3. kongresa kardiologa i angiologa Bosne i Hercegovine s međunarodnim učešćem/ Kušljugić, Zumreta (ur.).
Tuzla : Univerzitetski Klinički centar Tuzla, 2004. 42 (predavanje,sažetak,stručni).

7. Marjanac, Igor; Pinotić, Ljerka; Pavela, Jasna, Boranić, Milivoj; Pinotić, Krešimir. Antiglijadinska i antiendomizijska antitijela u djece niskog rasta// Europediatrics 2003 (CD-ROM)/ Katz, Manuel ; Janda, Jan (ur.). Prag : UNEPSA i Kenes International, 2004. 4 (poster,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

8. Marjanac, Igor; Pinotić, Ljerka; Štimac, Maja. Evaluacija djece novootkrivenih inzulin ovisnih dijabetičara liječenih na dječjem odjelu Kliničke bolnice Osijek// Paediatria Croatica/ Barišić, Ingeborg; Mardešić, Duško (ur.). Zagreb : Ministry of Science and Tehnology Republic of Croatia, 2004. 16 (poster, sažetak, stručni).

9. Pinotić, Ljerka; Marjanac, Igor; Pušeljić, Silvija; Pinotić, Krešimir; Žuro-Tijardović Ivanka; Štajner-Brezničar, Rea; Takač, Boris; Dokonal, Zrinka. Učestalost pozitivnog serološkog nalaza Helycobacter pylori u djece s recidivnim bolovima u trbuhu// Knjiga sažetaka - Simpozij pedijatara - Osijek 2003/ Berecki, Igor (ur.). Osijek : Grafika, 2004. 28 (poster, sažetak, stručni).

10. Marjanac, Igor; Vučemilović-Šimunović, Iva. Carneyev sindrom - prikaz bolesnika// Knjiga sažetaka - Simpozij pedijatara - Osijek 2003/ Berecki, Igor (ur.). Osijek : Grafika, 2003. 24 (poster, sažetak, stručni).

11. Pinotić, Ljerka; Marjanac, Igor; Boranić, Milivoj; Mandić, Zlatko. Evaluacija dislipidemija u djece oboljele od dijabetesa melitusa tip I, djece s intolerancijom glukoze i pretile djece// Knjiga sažetaka Trećeg hrvatskog endokrinološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem/ Altabas, Velimir (ur.). Zagreb : Studio FRG doo, Zagreb, 2003. 115-115 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

12. Pehlić, Marina; Vrkić, Dina; Škrabić, Veselin; Stipančić, Gordana; Špehar Uroić, Anita; Marjanac, Igor; Jakšić, Jasminka; Kačić, Zrinka; Boraska, Vesna; Zemunik, Tatijana: Exploring the genetic overlap of autoimmune risk loci with T1DM// Final Program and Abstracts, The seventh ISABS Conference in forensic, anthropologic and medical genetics and Mayo Clinic Lectures in translational medicine/ ISABS and Croatian Academy of Science and Arts (ur.). Zagreb : International Society for Applied Biological Sciences, 2011. 201-201 (poster,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).