

**Univerzitet u Beogradu
Farmaceutski fakultet**

Dragana V. Bojanin

**RANI LIPIDNI I INFLAMATORNI MARKERI
ATEROSKLEROZE KOD DECE SA
TIPOM 1 DIJABETES MELITUSA: UTICAJ
METABOLIČKE KONTROLE I
KOMORBIDITETA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020

**University of Belgrade
Faculty of Pharmacy**

Dragana V. Bojanin

**EARLY LIPID AND INFLAMMATORY
MARKERS OF ATHEROSCLEROSIS IN
CHILDREN WITH TYPE 1 DIABETES
MELLITUS: EFFECTS OF METABOLIC
CONTROL AND COMORBIDITIES**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2020

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije

***dr Vesna Spasojević-Kalimanovska, mentor, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet***

***dr Jelena Vekić, mentor, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet***

***dr Ana Ninić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu- Farmaceutski fakultet***

***dr Tatjana Milenković, naučni saradnik
Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije “Dr Vukan Čupić” u Beogradu***

Datum odbrane doktorske disertacije

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Vesne Spasojević-Kalimanovske i prof. dr Jelene Vekić. Deo disertacije je urađen u Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ u Beogradu.

Tokom izrade disertacije imala sam izuzetnu podršku i veliku pomoć svojih mentora. Iskreno im se zahvaljujem na ukazanom poverenju i izvanrednom stručnom vođenju. Zahvaljujem se prof. dr Ani Ninić na stručnoj podršci, entuzijazmu i posvećenosti. Značajan doprinos eksperimentalnom delu ove disertacije, svojim znanjem i profesionalizmom, pružile su moje kolege sa Katedre za medicinsku biohemiju.

Veliku zahvalnost dugujem dr Tatjani Milenković za ukazano poverenje, razumevanje i ostvarenu saradnju. Posebno se zahvaljujem lekarima i medicinskim sestrama Odeljenja i ambulante endokrinologije, dr Ilijani Mažibradi iz Republičkog centra za planiranje porodice i svojim saradnicima u laboratoriji koji su mi neizmerno pomogli u odabiru ispitanika i sakupljanju uzoraka.

Veliko hvala mojim prijateljima za bezrezervnu podršku, podsticaj i veru da ću istrajati u svom radu.

Ovaj rad, uz zahvalnost za bezgraničnu ljubav, posvećujem mojoj porodici.

Rani lipidni i inflamatorni markeri ateroskleroze kod dece sa tipom 1 dijabetes melitusa: uticaj metaboličke kontrole i komorbiditeta

Cilj ove disertacije je bio određivanje lipidnih i inflamatornih markera ateroskleroze kod dece sa tipom 1 dijabetes melitusa (T1DM) (N=201) i zdrave dece (N=141), ispitivanje njihove međusobne povezanosti, kao i uticaja metaboličke kontrole i komorbiditeta na analizirane parametre. To je uključilo određivanje standardnog lipidnog profila, veličine i raspodele subfrakcija lipoproteina niske (LDL) i visoke (HDL) gustine, koncentracije proprotein konvertaze subtilisin keksin tip 9 (PCSK9), koncentracije i genske ekspresije receptora za krajnje produkte uznapredovale glikacije (RAGE) i transformišućeg faktora rasta $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) u mononuklearnim ćelijama periferne krvi. U grupi sa T1DM bilo je 30 pacijenata sa pridruženim autoimunskim tireoiditisom i 15 sa pridruženom celijačnom bolešću. Koncentracije HDL-holesterola su bile više kod dece sa T1DM u odnosu na zdravu decu, dok se drugi parametri lipidnog profila nisu značajno razlikovali. Pacijenti sa neadekvatnom metaboličkom kontrolom su imali više koncentracije PCSK9 i veće udele malih HDL subfrakcija. U grupi sa dobrom metaboličkom kontrolom je utvrđena negativna korelacija između koncentracija PCSK9 i udela malih LDL čestica. Ekspresija gena za RAGE i TGF- $\beta 1$ je bila značajno niža, a koncentracije značajno više kod dece sa T1DM. Koncentracije TGF- $\beta 1$ u plazmi pacijenata sa T1DM su pozitivno korelirale sa udelom malih HDL subfrakcija, a genska ekspresija sa povećanom ekskrecijom albumina. Pacijenti sa pridruženom celijačnom bolešću su imali najniže koncentracije HDL-holesterola, najmanje dijametare HDL čestica i najveći indeks ateroskleroze. Rezultati su ukazali na značaj određivanja lipidnih i inflamatornih markera i ranog povećanja ekskrecije albumina u prevenciji dijabetesnih komplikacija.

Ključne reči: Tip 1 dijabetes melitus, ateroskleroza, inflamacija, dislipidemija, metabolička kontrola, PCSK9, TGF- $\beta 1$, RAGE, komorbiditet

Naučna oblast: Medicinske nauke-Farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

Early lipid and inflammatory markers of atherosclerosis in children with type 1 diabetes mellitus: effect of metabolic control and comorbidities

The aim of this thesis was to determine lipid and inflammatory markers of atherosclerosis in children with type 1 diabetes mellitus (T1DM) (N=201) and healthy children (N=141), to investigate their mutual relationships and the effects of metabolic control and comorbidities on examined markers. Standard lipid profile, low-density (LDL) and high-density (HDL) size and subclasses distribution, concentration of proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9), and concentrations and gene expression of receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) in peripheral blood mononuclear cells were determined. In T1DM group 30 patients had associated autoimmune thyroiditis and 15 patients had celiac disease. HDL-cholesterol (HDL-C) levels were higher in children with T1DM, while other lipid status parameters did not differ between the groups. Patients with inadequate metabolic control had increased PCSK9 levels and higher proportion of small HDL subfractions. In the group with good metabolic control an inverse association between PCSK9 level and proportion of small LDL particles was found. Gene expression of RAGE and TGF- β 1 was significantly lower and plasma concentrations were significantly higher in children with T1DM. TGF- β 1 levels in plasma of T1DM patients were positively associated with the proportion of small HDL subfractions, and higher gene expression was associated with increased albumin excretion. Patients with associated celiac disease had the lowest concentrations of HDL-C, the smallest diameter of HDL particles, and the highest index of atherosclerosis. The results indicated importance of lipid and inflammatory markers and early increase of albumin excretion determination for prevention of diabetic complications.

Key words: Type 1 diabetes mellitus, atherosclerosis, inflammation, dyslipidemia, metabolic control, PCSK9, TGF- β 1, RAGE, comorbidity

Scientific field: Medical sciences-Pharmacy

Special Topic: Medical biochemistry

Skraćenice

ADA - Američka asocijacija za dijabetes
AGE - produkti uznapredovale glikacije
aIMT - debljina intime medije aorte
APC - antigen prezentujuće ćelije
apoA1 - apolipoprotein A1
apoB - apolipoprotein B
ATD - autoimunski tireoiditis
CB - celijačna bolest
CETP- holesterol estar transferni protein
cIMT - debljina intime medije karotidnih arterija
DAG - diacilglicerol
eGDR- procenjena brzina uklanjanja glukoze iz plazme
EGFPH - domen homologan prekursoru epidermalnog faktora rasta
ELISA - enzimski imunoesej
esRAGE - endogeni sekretorni receptor za krajnje produkte uznapredovale glikacije
GADA - antitela na glutamat dekarboksilazu
GADPH - gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
HBA1c - glikohemoglobin
HDL - lipoprotein visoke gustine
HDL-H - holesterol u lipoproteinima visoke gustine
HNF-1 α - hepatični nuklearni faktor-1 α
hsCRP - C reaktivni protein visoke osetljivosti
ICAM-1 - intercelularni adhezivni molekul-1
iRNK - informaciona ribonukleinska kiselina
JGF - jačina glomerularne filtracije
KG - kontrolna grupa
KVB - kardiovaskularne bolesti
LDL - lipoprotein niske gustine
LDL-H - holesterol u lipoproteinima niske gustine
LDLR- receptor za lipoprotein niske gustine
LOX-1- lektinu sličan receptor za oksidovani lipoprotein niske gustine
MAPK - mitogenom aktivirana protein kinaza
MTP - mikrozomalni transportni protein
NF- κ B - nuklearni faktor kapa B
PAI-1 - inhibitor aktivatora plazminogena-1
PARP - poli ADP-riboza polimeraza
PBMC - mononuklearne ćelije periferne krvi
PCSK9 - proprotein konvertaza subtilisin keksin tip 9
PDGF - faktor rasta poreklom iz trombocita
PKC - protein kinaza C
PON1 - paraoksonaza 1
RAGE- receptor za krajnje produkte uznapredovale glikacije
Real time-PCR - reakcija lančane polimerizacije u realnom vremenu

SAA - serumski amiloid A
sdLDL - male guste LDL čestice
sRAGE - solubilne izoforme receptora za krajnje produkte uznapredovale glikacije
SREBP - sterol regulatorni element vezujući protein
T1DM - Tip 1 dijabetes melitusa
T2DM - Tip 2 dijabetes melitusa
TG - trigliceridi
TGF- β 1 - transformišući faktor rasta β 1
TNF- α - faktor nekroze tumora α
Treg - regulatorne T ćelije
TRL - lipoproteini koji pretežno sadrže trigliceride
VCAM-1 - adhezivni molekul vaskularnih ćelija-1
VLDL- lipoprotein veoma niske gustine

Sadržaj

1.	Uvod	1
1.1.	Faktori rizika za razvoj ateroskleroze u T1DM	7
1.1.1.	Metabolička kontrola T1DM i dislipidemija	7
1.2.	Proteinski konvertaza subtilisin kexsin tip 9 (PCSK9)	10
1.2.1.	Hepatična regulacija ekspresije PCSK9 gena	14
1.2.2.	Ekstrahepatična ekspresija PCSK9	15
1.2.3.	PCSK9 u pedijatrijskoj populaciji sa T1DM	16
1.3.	Receptor za krajnje produkte uznapredovale glikacije (RAGE)	17
1.3.1.	Uloga RAGE u razvoju T1DM	18
1.3.2.	Uloga RAGE u razvoju ateroskleroze	19
1.4.	Transformišući faktor rasta $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)	20
1.5.	Komorbiditeti T1DM i rizik za razvoj KVB	23
2.	Ciljevi	25
3.	Materijal i metode	26
3.1.	Ispitanici	26
3.2.	Laboratorijske analize	27
3.2.1.	Određivanje koncentracije PCSK9 u plazmi	27
3.2.2.	Određivanje koncentracije sRAGE i TGF- $\beta 1$ u plazmi	28
3.3.	Antropometrijska merenja i evaluacija faktora kardiovaskularnog rizika	28
3.4.	Određivanje veličine i raspodele LDL i HDL subfrakcija	29
3.5.	Određivanje genske ekspresije RAGE i TGF- $\beta 1$	30
3.5.1.	Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi i RNK	30
3.5.2.	Određivanje koncentracije i ispitivanje kvaliteta izolovane RNK	30
3.5.3.	Reverzna transkripcija	31
3.5.4.	Real-Time PCR (qPCR)	31
3.6.	Statistička analiza	33
4.	Rezultati	34
4.1.	Demografske karakteristike ispitanika	34
4.2.	Lipidni markeri ispitanika	36
4.2.1.	Parametri serumskog lipidnog profila	36
4.2.2.	Profil LDL i HDL subfrakcija	37
4.2.3.	Koncentracija PCSK9	39
4.3.	Inflamatorni markeri	46
4.3.1.	Genska ekspresija inflamatornih markera u mononuklearnim ćelijama	47
4.3.2.	Koncentracije inflamatornih markera u plazmi	47
4.4.	Biohemijski parametri funkcije bubrega, jetre i tireoidne žlezde	58
4.5.	Uticaj metaboličke kontrole na lipidne i inflamatorne markere ateroskleroze	59
4.5.1.	Demografske karakteristike i biohemijski parametri pacijenata sa T1DM u odnosu na postignutu metaboličku kontrolu	59
4.5.2.	Profil LDL i HDL subfrakcija pacijenata sa T1DM u odnosu na postignutu metaboličku kontrolu	62
4.5.3.	Koncentracije PCSK9 kod pacijenata sa T1DM u odnosu na postignutu metaboličku kontrolu	63
4.5.4.	Korelacije PCSK9 sa LDL i HDL subfrakcijama	67
4.5.5.	Korelacije PCSK9 i malih, gustih LDL čestica sa indeksom insulinske rezistencije	71
4.5.6.	Markeri inflamacije kod pacijenata sa T1DM u odnosu na postignutu metaboličku kontrolu	72
4.6.	Uticaj pridruženih autoimunskih bolesti na lipidne markere ateroskleroze	73

4.7.	<i>Povezanost ranih lipidnih i inflamatornih markera ateroskleroze sa razvojem komplikacija T1DM</i>	82
5.	<i>Diskusija</i>	92
6.	<i>Zaključci</i>	110
7.	<i>Literatura</i>	112

1. Uvod

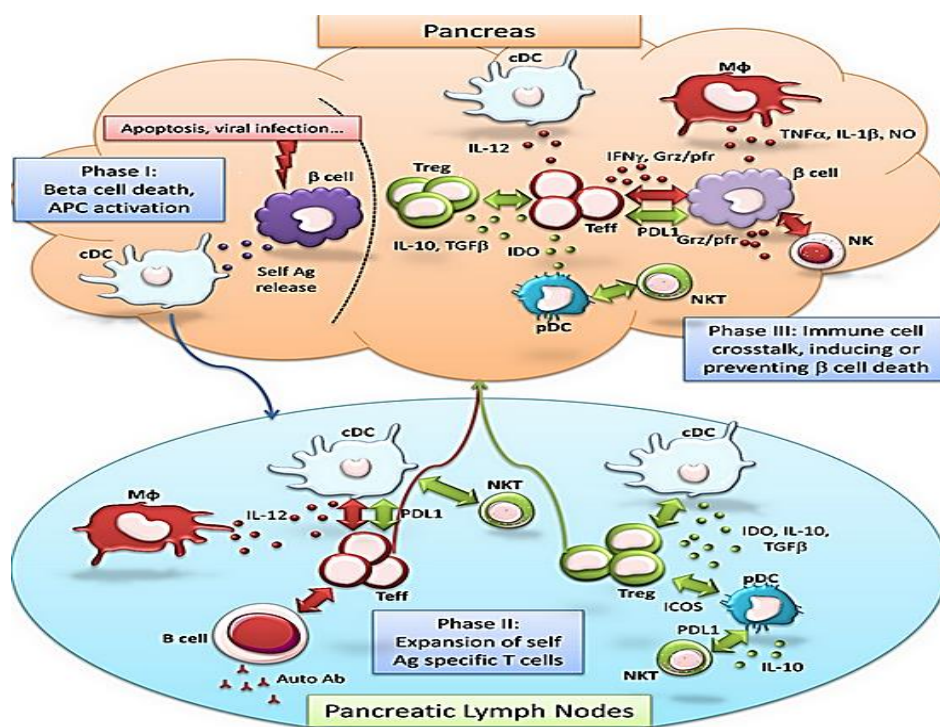
Tip 1 dijabetes melitusa (T1DM) je hronična autoimunska bolest koja se karakteriše delimičnim ili potpunim deficitom insulina i posledičnom hiperglikemijom. Ovaj kompleksni metabolički poremećaj nastaje kao rezultat interakcije genoma, imunskog sistema i mikrobioma pod uticajem faktora spoljašnje sredine i karakteriše se izraženim individualnim varijacijama. U osnovi, rezultuje destrukcijom β ćelija pankreasa koje proizvode insulin, uglavnom posredstvom T ćelija (1-3). Epidemiološka istraživanja pokazuju da T1DM spada u najučestalije autoimunske bolesti u pedijatrijskoj populaciji. Incidenca i prevalenca ove bolesti su, globalno, u porastu. Razlika u incidenci T1DM kod populacija sa sličnom genetskom predispozicijom ali različitim socioekonomskim uslovima, ukazuje na rastući uticaj bihevioralnih i faktora životne sredine i ističe potrebu za razumevanjem složene interakcije predispozicije i okruženja individue u patogenezi autoimuskog poremećaja (1). Najveći rast incidence se beleži kod dece mlađe od 15 godina, posebno u predškolskom uzrastu (1). Prema novijim epidemiološkim podacima u Evropi, zemlje Skandinavije, Velika Britanija, Irska i delovi Italije imaju najveću incidencu T1DM u pedijatrijskoj populaciji (čak do 60,9/100 000 u Finskoj), ali intenzivni porast incidence se beleži, uglavnom, u zemljama u razvoju (4). Najviši rast incidence u periodu od 2009. do 2013. godine je zabeležen u Poljskoj (6,6%), a najniži u Kataloniji (0,5%). Od zemalja u regionu, incidenca ove bolesti, u istom periodu, je rasla najviše u Severnoj Makedoniji (4,8%), Mađarskoj (4,3%), Crnoj Gori (4,2%), zatim u Sloveniji i Hrvatskoj (3,9%) (4). Prema aktuelnim podacima, prosečna standardna incidenca T1DM u Srbiji, u periodu od 2007. do 2017. godine, iznosila je 11,82/100 000 za uzrast od 0 do 19 godina, odnosno 14,28/100 000 kod dece uzrasta od 0 do 14 godina. Prosečno godišnje povećanje incidence u Srbiji u posmatranom periodu je bilo 5,9% (5).

Globalni porast prevalencije T1DM je uslovljen višestrukim činiocima. Pokazano je da je usled unapređenja insulinske terapije i razvoja moderne medicine povećan kvalitet i dužina života obolelih i posledično akumulacija genetske predisponiranosti u populaciji i globalno i regionalno. Pored toga, povećano preživljavanje novorođenčadi i stopa nataliteta se odražavaju na prevalencu T1DM na populacionom nivou (6). Iako je T1DM bolest koja najčešće počinje u detinjstvu, veći deo populacije sa ovom bolešću je adultnog uzrasta, pre svega, zbog značajno produženog životnog veka osoba sa T1DM (7). Pokazano je da prevalenca T1DM kod mladih ima tendenciju rasta u većini zemalja u svetu, ali je izražen skok u regionima sa brzim ekonomskim razvojem (8).

T1DM je nasledna, poligenetska bolest. HLA II (eng. *human leucocyte antigen class II*) region na hromozomu 6 se povezuje sa visokim rizikom od oboljevanja, gde specifične kombinacije DR i DQ alela određuju genetsku predispoziciju ka razvijanju T1DM. Dva haplotipa, DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 i DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02 (označavaju se i kao DR3/DR4 haplotipovi ili DQ2/DQ8 po serološkoj nomenklaturi), na hromozomu 6, uključena u antigensku prezentaciju, doprinose približno 50% heritabilnosti T1DM (9-11). U okviru GWAS studije (eng. *Genome-wide association study*) je identifikovano preko 60 genskih lokusa, pored pomenutih HLA lokusa, koji nose povećan rizik za oboljevanje od T1DM (12). Ove genske varijante su najčešće determinante funkcija imunskog sistema, kao npr. ekspresije gena za insulin (*INS*) u timusu koja utiče na razvoj imunske tolerancije (polimorfizmi promotornog regiona insulinskog gena koji se odnose na varijabilni broj tandemskih ponavljanja VNTR-eng. *variable number tandem repeat*) (12,13). Regulacija aktivacije T ćelija, razvoja i održavanja imunske tolerancije je određena varijantama gena *PTPN 22* (eng. *protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22*), koji kodira sintezu limfoid specifične fosfataze (LYP)- supresora aktivacije T ćelija (14), zatim *CTLA4* (eng. *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), koji je negativni regulator citotoksičnih T ćelija (15) i *IL2RA* (eng. *interleukin-2 receptor alpha chain*) koji reguliše funkciju regulatornih T ćelija (16). Genetsku predispoziciju za T1DM karakterišu i aberantni odgovori na stimuluse spoljašnje sredine kao što su virusi (mutacije na genu za IFIH1, eng. *interferon induced helicase*) ili izmenjeni biohemijski putevi uslovljeni varijantama gena za vitamin D (17,18). Uticaji spoljašnje sredine (infektivni, nutritivni,

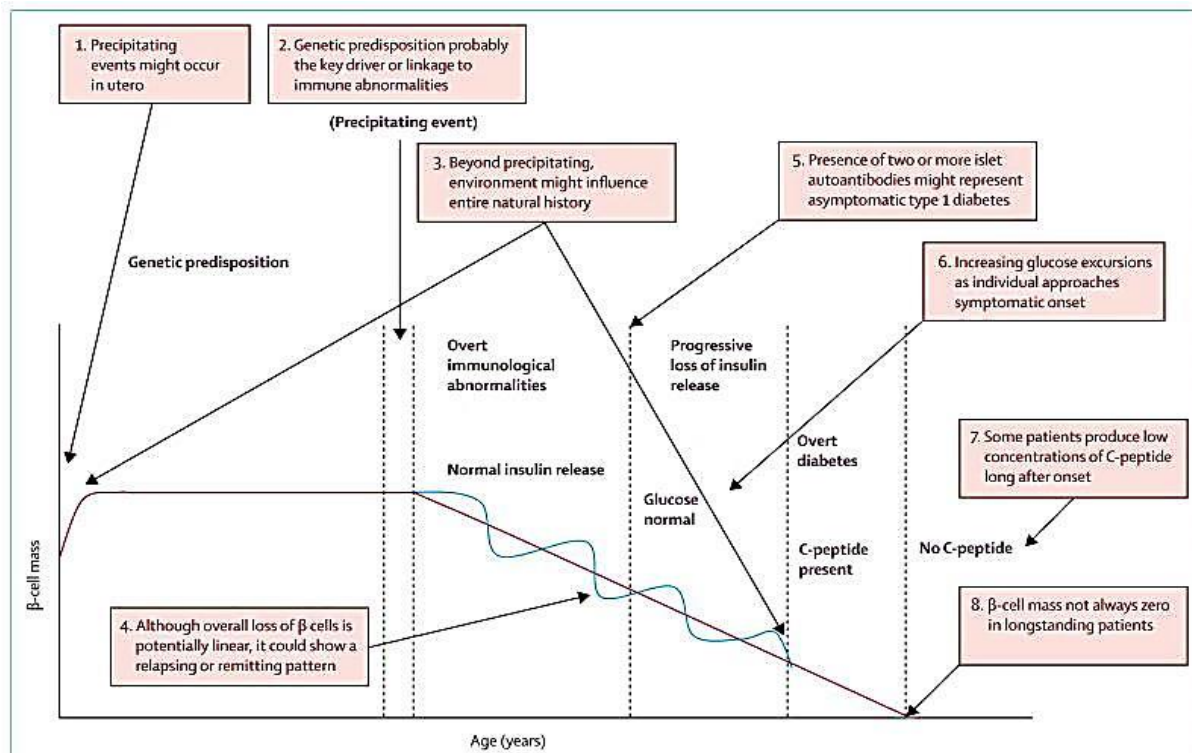
hemijski) koji iniciraju destrukciju pankreasnih β ćelija i mehanizmi njihovog delovanja su nedovoljno razjašnjeni, ali je ustanovljeno da procesi uslovljeni ovim uticajima započinju mesecima ili godinama pre kliničkih simptoma bolesti (1). Infekcije enterovirusima tokom trudnoće, pedijatrijskog i adultnog uzrasta, se povezuju sa razvojem autoimunosti i dijabetesa, posebno ako su se infekcije ispoljile tokom ranog detinjstva (19,20). Sindrom izazvan kongenitalnom rubelom je takođe povezan sa nastankom bolesti, a postoje i istraživanja o uticaju virusa influence, citomegalo i rota virusa (21). Novija istraživanja posvećuju pažnju brojnim nutritivnim činiocima koji se povezuju sa razvojem T1DM poput rane izloženosti kravljem mleku i glutenu, nedostatka vitamina D ili protektivnom delovanju majčinog mleka (22-27). Pored ovih, ispitivanja nespecifičnih promotera i akceleratora destrukcije β ćelija u detinjstvu (gojaznost, insulinska rezistencija, povećan unos glukoze, psihofizički stres), su dala doprinos ali ne i definitivni dokaz o uzroku bolesti (28,29). Kombinacija ili redosled izloženosti mogućim uzročnicima iz spoljašnje sredine, rezultuje velikim intraindividualnim varijacijama u okviru populacije. Ova heterogenost objašnjava nekonzistentne ili kontradiktorne rezultate istraživanja u okviru različitih populacija (30).

Patogeneza T1DM je rezultat kompleksne interakcije β ćelija Langerhansovih ostrvaca pankreasa i komponenti urođenog i stečenog imuniteta. Smatra se da je razvoj T1DM iniciran poremećenom prezentacijom peptida β ćelija preko antigen prezentujućih ćelija (APC, eng. *antigen presenting cells*), koje noseći ove autoantigene migriraju u limfne čvorove pankreasa (Slika 1), gde iniciraju autoimunski odgovor (31,32). APC intereaguju sa autoreaktivnim CD4+ T limfocitima, koji dalje aktiviraju autoreaktivne CD8+ ćelije. CD8+ T limfociti u pankreasnim ostrvcima liziraju β ćelije, koje na svojoj površini ekspiriraju imunogeni peptid na molekuli glavnog histokompatibilnog kompleksa klase I (MHC I, eng. *major histocompatibility complex class I*), putem sekrecije proteina citotoksičnog delovanja, perforina i granzima (33). Destrukcija β ćelija se odvija i putem CD4+ ćelija koje sekretuju interferon- γ ili posredstvom proinflamatornih citokina, pre svega *tumor necrosis factor α* (TNF- α) i interleukina β 1 (IL- β 1), kao i medijatora oksidativnog stresa koje oslobađaju ćelije urođenog imuniteta, poput makrofaga i NK ćelija (eng. *natural killer*) (34, 35). Ceo proces je verovatno omogućen poremećajima imunske tolerancije, tj. nedovoljnom aktivnošću regulatornih T ćelija (Treg) u suprimiranju autoimunosti. U pankreasnim limfnim ćelijama se aktiviraju i B ćelije koje proizvode specifična autoantitela, usmerena protiv peptidnih antigena β ćelija. Moguća uloga B ćelija u patogenezi T1DM je i antigenska prezentacija koja obezbeđuje specifičnu aktivnost T ćelija u pankreasnim ostrvcima (36-38). Inflamatorni proces koji zahvata β ćelije pankreasa (insulitis) se karakteriše infiltracijom imunskih ćelija, pre svega CD8+ T limfocita i makrofaga, te manjim količinama CD4+ limfocita, B (CD20+) limfocita, plazma (CD138+) ćelija i retkim regulatornim T ćelijama (39).



Slika 1. Interakcija ćelija urođenog i stečenog imuniteta u pankreasu tokom razvoja tip 1 dijabetesa. Preuzeto iz: Diana J, Gahzarian L, Simoni Y, Lehuen A. Innate Immunity in Type 1 Diabetes. Discov Med. 2011; 11: 513-20..

U trenutku dijagnoze T1DM, oboleli imaju značajno umanjenu funkciju β ćelija u odnosu na zdrave osobe. Međutim, promene koje zahvataju pankreasna ostrvca počinju mnogo ranije u odnosu na kliničke znake i simptome bolesti. Model patogeneze T1DM koji predstavlja odnos funkcionalne mase β ćelija i starosti (40), pokazuje da se kod osoba sa genetskom predispozicijom pod uticajem faktora spoljašnje sredine ispoljavaju imunološke abnormalnosti β ćelija, što dovodi do progresivnog gubitka mase funkcionalnih ćelija (Slika 2). Progrediranje destrukcije β ćelija se manifestuje smanjenim lučenjem insulina koje ima promenljivi tok, a ogleda se u smanjivanju faza relapsa i remisije bolesti. U toku tog perioda održava se koncentracija glukoze u referentnom opsegu, uz moguće hiperglikemijske epizode. Tada je moguće detektovati jednu ili više vrsta autoantitela, koja predstavljaju serološke markere T1DM. Preko 90% osoba sa novootkrivenim T1DM ima serumska autoantitela protiv nekog od antigena β ćelija pankreasa: glutamat dekarboksilaze (GADA, eng. *glutamic acid decarboxylase 65 autoantibodies*), insulina (IAA, eng. *insulin autoantibodies*), β ćelijski specifičnog cink transportera 8 (ZnT8A, eng. *β -cell specific zinc transporter 8 autoantibodies*), antigena ćelija pankreasnih ostrvaca (ICA, eng. *islet cell antibodies*), ili autoantitela na tirozin fosfatazu (IA2, eng. *tyrosine phosphatase-like insulinoma antigen 2*) (41). Pokazano je da se kod većine osoba sa prisutnim jednim autoantitelom ne manifestuje T1DM, ali usled serokonverzije koja dovodi do stvaranja 2 ili više autoantitela, rizik za pojavu bolesti pre 18. godine raste na 84% (42,43). Gubitak kritične mase β ćelija (približno 90%) uslovljava kliničke znake T1DM i potrebu za insulinskom terapijom (1). Očuvanje preostalih funkcionalnih ostrvaca pankreasa, koje se tokom bolesti procenjuje na osnovu koncentracije C peptida, je individualno (1).



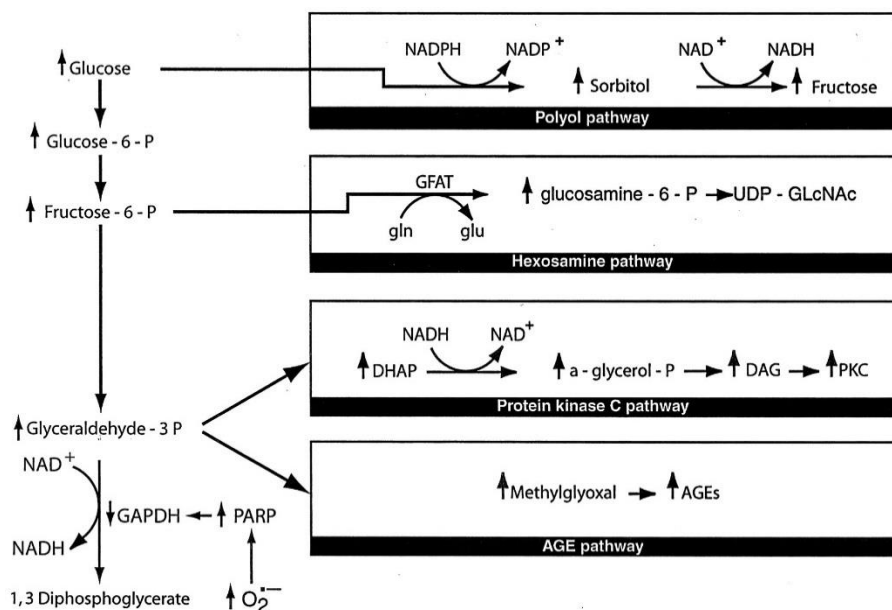
Slika 2. Shematski model patogeneze T1DM. Preuzeto iz: Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 Diabetes. Lancet. 2014; 383:69-82.

Terapija insulinom započinje neposredno posle dijagnostikovanja T1DM. Režim koji u najvećoj mogućoj meri prati fiziološke potrebe organizma je osnovni princip insulinske terapije pacijenta. Moderna terapija podrazumeva intenzivni režim u vidu multiplih dnevnih injekcija insulina ili kontinuirane subkutane insulinske infuzije (tzv. insulinske pumpe). Intenzivni režim, koji uključuje primenu humanih ili analoga insulina, postao je zlatni standard pedijatrijske dijabetologije (44). Randomizovane studije su potvrdile da intenzivni režim obezbeđuje bolju kontrolu glikemije u odnosu na režim koji podrazumeva dve doze insulina dnevno (45), kao i bezbednost primene insulinskih analoga u pedijatrijskoj populaciji (46,47).

T1DM je bolest koju prati povećani morbiditet i mortalitet, pre svega, zbog razvoja mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija. Mikrovaskularne komplikacije se primarno manifestuju kao nefropatija, neuropatija i retinopatija, ali utiču i na kognitivne funkcije, rad srca i drugih organa. Makrovaskularne komplikacije u osnovi imaju aterosklerozu i trombozu krvnih sudova srca, perifernih arterija i mozga. Manifestuju se uglavnom kao kardiovaskularne bolesti (KVB) od kojih najveću prevalencu imaju ishemijske bolesti srca i cerebrovaskularni insulti (48, 49).

Ključni činilac razvoja vaskularnih komplikacija u dijabetesu je akutna i hronična hiperglikemija koja pokreće nekoliko intracelularnih mehanizama poput aktivacije poliolskog i heksozaminskog metaboličkog puta, aktivacije protein kinaze C (PKC) posredstvom diacilglicerola (DAG), povećano stvaranje krajnjih produkata uznapredovale glikacije (AGE, eng. *advanced glycation end products*), te povećanu sintezu faktora rasta, citokina i slobodnih kiseoničnih radikala (50,51). Metabolički put stvaranja poliola u ćeliji podrazumeva aktivnost enzima aldoza-reduktaze koja redukuje glukozu u sorbitol. U fiziološkim uslovima, sorbitol se oksiduje do fruktoze u prisustvu sorbitol-dehidrogenaze, a nastala fruktoza se dalje metaboliše. U slučaju hiperglikemije, sorbitol se sintetiše u količini koja prevazilazi mogućnost oksidacije, te dolazi do njegove akumulacije u ćeliji, poremećaja regulacije osmotskog statusa ćelije, redukovane aktivnosti Na^+/K^+ -ATP-aze, povećanja odnosa NADH/NAD^+ u citozolu i smanjenja koncentracije NADPH (52,53).

U heksozaminskom metaboličkom putu fruktoza-6-fosfat se konvertuje u N-acetil glukozamin, koji aktivira transkripcioni faktor Sp1 uključen u sintezu faktora rasta, poput transformišućeg faktora rasta $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$, eng. *transforming growth factor beta 1*) i inhibitora aktivatora plazminogena 1 (PAI-1, eng. *plasminogen activator inhibitor 1*). Ovi medijatori imaju značajne uloge u nastanku vaskularnih komplikacija. Posledica aktivacije heksozaminskog puta je i razvoj oksidativnog stresa i posledično produkata oksidativnog oštećenja (54,55). Hiperglikemija stimuliše sintezu DAG što prethodi aktivaciji PKC. PKC je modulator aktivnosti različitih enzima, uključujući fosfolipazu A2, Na⁺/K⁺-ATP-azu, zatim ekspresije gena uključenih u sintezu komponenti ekstracelularnog matriksa u tkivima. Pored toga izmenjena aktivnost PKC utiče na funkciju endotela, vaskularnu permeabilnost i dilataciju, ćelijski rast i apoptozu, što dovodi do razvoja dijabetesnih komplikacija (56). AGE ostvaruju svoju biološku funkciju uglavnom vezivanjem za svoje receptore RAGE (eng. *receptor for advanced glycation end products*) i sukcesivnom indukcijom oksidativnog stresa, oslobađanja citokina i faktora rasta, što rezultuje hroničnom inflamacijom i endotelnom disfunkcijom (57). Zajedničko za sve navedene metaboličke puteve je da ih pokreće intracelularna inhibicija gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GADPH), enzima uključenog u glikolizu. Inhibicija ovog enzima je uslovljena povećanim stvaranjem superoksid anjon radikala u uslovima hiperglikemije, koji se aktivnošću mitohondrijalne superoksid-dismutaze razlažu do vode i molekularnog kiseonika. Posledica inhibicije GADPH je akumulacija svih intermedijera glikolize koji onda postaju supstrati u prethodno opisanim metaboličkim putevima razvoja ćelijskog oštećenja u dijabetesu (50). Daljom analizom, utvrđeno je da se intracelularna inhibicija GADPH vrši njegovom post-translacionom modifikacijom koju katalizuje enzim koji učestvuje u reparaciji DNK u nukleusu, poli ADP-riboza polimeraza (PARP) (58). Kada se u uslovima hiperglikemije i povećane intracelularne glukoze generišu superoksid anjon radikali tj. slobodni kiseonični radikali, dolazi do oštećenja DNK u nukleusu, posledične aktivacije PARP koji razlaže NAD⁺ molekule na nikotinsku kiselinu i ADP-ribozu, čiji se polimeri akumuliraju na GADPH i na taj način inhibiraju aktivnost ovog enzima. Konačno, inhibicija GADPH povećava koncentraciju gliceraldehid-3-fosfata od koga se stvara metil-glioksal, glavni prekursor za nastanak AGE i DAG (58). Prethodno je objašnjeno da DAG aktivira signalni put u kom sudeluje PKC, dok pod dejstvom AGE dolazi do aktivacije NF- κ B transkripcionog faktora. Pored ovoga, inhibicija GADPH dovodi do akumulacije fruktoza-6-fosfata i glukoze i do posledičnog povećanja njihovog fluksa kroz heksozaminski i put stvaranja poliola (50) (Slika 3).



Slika 3. Biohemijski mehanizmi u osnovi dijabetesnih komplikacija. Preuzeto iz: Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. Diabetes. 2005;54:1615–25.

Novija istraživanja ukazuju na dodatne mehanizme, koji podrazumevaju uticaje epigenetskih promena i različitih mikro RNK u patogenezi dijabetesnih vaskularnih komplikacija (59). Smatra se da su ćelije koje imaju najmanje razvijene mehanizme za smanjenje transporta glukoze u citoplazmu u uslovima hiperglikemije u najvećoj meri podložne oštećenjima, a to su endotelne ćelije kapilara retine, mezangijalne ćelije u glomerulu i Švanove ćelije neurona perifernog nervnog sistema (50). Longitudinalne studije su pokazale da, za razliku od uloge u razvoju mikrovaskularnih komplikacija u dijabetesu, hiperglikemija nije ključni činioc u nastanku makrovaskularnih oštećenja u dijabetesu, što ukazuje na potrebu za ispitivanjem i drugih faktora rizika (60-62). U skladu sa temom ove doktorske disertacije, u nastavku će biti reči o makrovaskularnim komplikacijama T1DM.

1.1. Faktori rizika za razvoj ateroskleroze u T1DM

T1DM je prepoznat kao nezavisni faktor rizika za kardiovaskularne bolesti u čijoj osnovi je ateroskleroza. Procenjeno je da oboleli od T1DM imaju 10 puta veći rizik za razvoj KVB u odnosu na osobe iste starosne dobi koje nemaju dijabetes (63). Novija istraživanja pokazuju visoku stopu mortaliteta kod osoba sa T1DM, uprkos unapređenju terapije insulinom i lečenja KVB (64). U detinjstvu i adolescenciji su retke manifestacije KVB, ali pokazano je da je prevalenca rane ateroskleroze kod dece i adolescenata sa T1DM značajno veća u odnosu na vršnjake koji nisu oboleli od dijabetesa, kao i da se njena učestalost povećava 3-4 puta u starijem uzrastu (65,66). Brojne studije koje su utvrdile povećanje debljine intime medije aorte i karotidnih arterija (aIMT i cIMT), kao i znake „tih“ koronarne ateroskleroze kod mladih osoba koje su obobile od T1DM u detinjstvu, su pružile dokaz da aterosklerotske promene na krvnim sudovima u T1DM počinju u detinjstvu, a ubrzavaju se u pubertetu i adolescenciji (65, 67-69). Ipak, pravi uzrok rane pojave i ubrzanog progrediranja ateroskleroze ka KVB u dijabetesu još uvek nije pronađen. Patohistološke studije, među kojima je najpoznatija PDAY studija (eng. *Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study*) (70), su potvrdile postojanje aterosklerotskih lezija na krvnim sudovima i kod zdrave dece i mladih, posebno uz istovremeno prisustvo tradicionalnih faktora rizika-hiperglikemiju, dislipidemiju, hipertenziju, gojaznost i pušenje (71). Većoj prevalenci ateroskleroze kod obolelih doprinose dodatni faktori rizika karakteristični za dijabetes, poput unapredovale glikacije, mikroalbuminurije, oksidativnog stresa i inflamacije, koji su prepoznati i u pedijatrijskoj populaciji (66,72-74).

1.1.1. Metabolička kontrola T1DM i dislipidemija

Dugoročne, longitudinalne studije poput DCCT/EDIC (eng. *Diabetes Control and Complication Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complication*) i EDC (eng. *Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications*) su pokazale da je postizanje adekvatne metaboličke kontrole, odnosno održavanje udela glikohemoglobina (HbA_{1c}) u preporučenim granicama, ključni faktor za sprečavanje razvoja komplikacija u dijabetesu (75-77). Njihov zaključak je da intenzivni insulinski režim, poboljšanjem metaboličke kontrole, tj. smanjenjem udela HbA_{1c} dovodi do značajnog smanjenja učestalosti i mikro- i makrovaskularnih komplikacija. Pored toga, u EDIC studiji je pokazano da je lečenje dijabetesa kod mladih pacijenata, koje je uključivalo intenzivnu terapiju insulinom i postizanje dobre metaboličke kontrole, posle 17 godina od početka studije, smanjilo nepovoljne ishode KVB za 57%, pa čak i uz povremeno pogoršanje HbA_{1c} (60). Dugoročni nepovoljni uticaj prethodnih hiperglikemijskih epizoda na razvoj KVB nazvano je „metaboličkom memorijom“ ili „efektom nasleđa“, čiji mehanizam još uvek nije razjašnjen (74,78). Brojne studije su pokazale povezanost neadekvatne metaboličke kontrole sa kliničkim parametrima subkliničke ateroskleroze, kao što je zadebljanje cIMT i krutost arterija, kao i sa pokazateljima poremećene funkcionalnosti srca (79-81).

Dislipidemija, kao najprominentniji faktor rizika za aterosklerozu, je neposredno povezana sa postignutom glikemijskom kontrolom kod obolelih od T1DM. Kod dece i adolescenata sa suboptimalnom ($7,5\% \leq HbA_{1c} < 9\%$) i lošom ($HbA_{1c} \geq 9\%$) glikemijskom kontrolom je nađena pozitivna korelacija između udela glikohemoglobina i koncentracije triglicerida (TG), LDL-holesterola (LDL-H, eng. *low density lipoprotein cholesterol*), non-HDL-holesterola (non-HDL-H, eng. *high density lipoprotein cholesterol*) i apolipoproteina B (82,83). Pacijenti sa dobrom glikemijskom kontrolom ($HbA_{1c} < 7,5\%$), najčešće imaju parametre lipidnog profila u okviru preporučenih granica, često sa nižim koncentracijama TG i višim koncentracijama HDL-H u odnosu na zdrave ispitanike (72,82-84).

Kao što je prethodno pomenuto, opsežne longitudinalne studije su pokazale dugotrajni pozitivan učinak striktnog održavanja metaboličke kontrole, postignute intenzivnom insulinskom terapijom, na razvoj vaskularnih komplikacija, ali ostavljajući patofiziološki mehanizam koji je do njih doveo, uglavnom nerazjašnjenim. Kako u T1DM ne dolazi do izrazitih promena u koncentraciji serumskih lipidnih parametara, potreban je detaljniji uvid u kvalitativna svojstva lipoproteinskih čestica, analizom veličine i raspodele lipoproteinskih subfrakcija. Najizraženije kvalitativne promene lipoproteina u dijabetesu su promene LDL subfrakcija, koje se ogledaju povećanjem udela malih gustih LDL čestica (sdLDL, eng. *small dense LDL*) sa visokim aterogenim potencijalom (83,85). Povećano stvaranje sdLDL se javlja usled neadekvatne metaboličke kontrole, gde u uslovima nedostatka insulina i/ili insulinske rezistencije dolazi do povećane sinteze lipoproteina koji pretežno sadrže TG (TRL, eng. *triglyceride-rich lipoproteins*), usporavanja njihovog katabolizma usled smanjene aktivnosti lipoproteinske lipaze i povećane aktivnosti holesterol ester transfernog proteina (CETP, eng. *cholesterol ester transfer protein*) (86). Proaterogeni potencijal sdLDL čestica potiče od više činilaca, koji su direktno povezani sa izmenjenim fizičko-hemijskim karakteristikama, usled smanjenja dimenzije čestica. Ove čestice imaju smanjen afinitet za LDL receptore (LDLR), što doprinosi sporijem uklanjanju iz cirkulacije, a vezuju se sa većim aviditetom za proteoglikane u subendotelnom prostoru čime je olakšano njihovo prodiranje i zadržavanje u zidu arterije (87). Kako je njihov klirens usmeren na ekstrareceptorske puteve, uglavnom ih preuzimaju makrofage u subendotelu arterija putem *scavenger* receptora (receptora-čistača), što vodi ka stvaranju penastih ćelija (85). Pokazano je da sdLDL imaju veću sklonost ka ubrzanom oksidaciji u odnosu na druge LDL subfrakcije zbog svog izmenjenog sastava, koji se ogleda u smanjenom sadržaju antioksidansa, izmenjenom sastavu lipidnog omotača i povećanom sadržaju polinezasićenih masnih kiselina (87). Ubrzana oksidacija lipida u subendotelnom prostoru može da pokrene hemotaksu monocita putem indukcije sinteze adhezionih molekula u endotelnim ćelijama i stimulacije sinteze proinflamatornih citokina u makrofagama. To amplifikuje inflamaciju i povećava verovatnoću za inicijaciju aterosklerotskog procesa (88). Povećani udeo sdLDL čestica se uglavnom javlja u tipu 2 dijabetes melitusa (T2DM), metaboličkom sindromu i gojaznosti, odnosno u stanjima koja se karakterišu insulinskom rezistencijom, ali njihovo prisustvo kod dece i adolescenata sa T1DM je pokrenulo dodatna istraživanja uzroka njihovog nastanka i uticaja na pojavu subkličičke ateroskleroze (83,89).

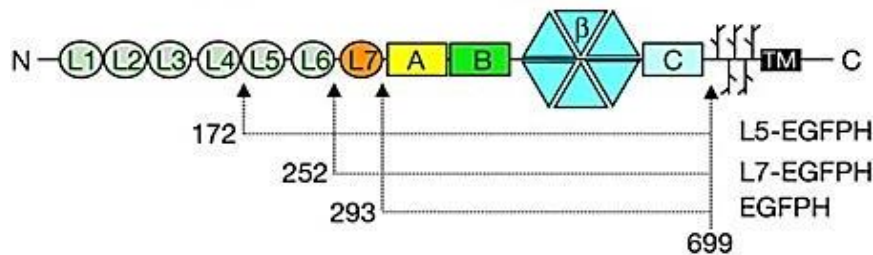
Prva studija koja je utvrdila pozitivnu korelaciju indikatora insulinske rezistencije u T1DM i stepena kalcifikacije koronarnih arterija, kao markera ateroskleroze, je pokrenula dalja istraživanja uzroka zbog kojih dolazi do razvoja insulinske rezistencije kod insulin zavisnih osoba sa T1DM (90). Pacijenti sa T1DM koji ispoljavaju kliničke znake T2DM poput gojaznosti i insulinske rezistencije se smatraju nosiocima „duplog dijabetesa“ (91). Kod pacijenata sa T1DM niske ili normalne telesne mase je pojava insulinske rezistencije uslovljena različitim mehanizmima. Jedan od mogućih razloga je nemogućnost postizanja adekvatne insulinske zamene, što pokreće hormonske i metaboličke poremećaje. Zatim, subkutana primena insulina vodi u portalni i sistemski hipoinsulinizam koji izaziva poremećaj u lučenju hormona rasta, glukagona i leptina, što povećava stepen insulinske rezistencije i pogoršava glikemijsku kontrolu (92). Dodatno, osetljivost na insulin se fiziološki smanjuje u pubertetu, pa je adolescentima potrebno povećanje doze insulina i do 30% (93). Izračunata procenjena brzina uklanjanja glukoze iz plazme (eGDR, eng. *estimated glucose disposal rate*) je indikator koji ima visoki stepen korelacije sa drugim, kliničkim metodama procene insulinske rezistencije, kao što je hiperinsulinemijski euglikemijski klamp (94,95). Skorašnje studije su pokazale da insulinska rezistencija može biti izražena kod adolescenata sa T1DM normalne telesne mase (96) i da ima uticaj na dislipidemiju i pogoršanje metaboličke kontrole, nezavisno od pubertetskog stadijuma (93).

Ateroprotektivna uloga HDL čestica počiva na njihovoj ključnoj fiziološkoj ulozi u reverznom transportu holesterola, na čemu se zasniva i hipoteza o recipročnom odnosu između koncentracije HDL-H i kardiovaskularnog rizika. HDL ima i druge vazoprotektivne osobine, pre svega antioksidativne, antiinflamatorne, antitrombotske, antiapoptotske i vazodilatatorne (97). Međutim, uočen je značajan rizik od KVB i kod osoba sa visokim koncentracijama HDL-H, ukazujući

da ateroprotektivna svojstva HDL čestica počivaju na veličini i sastavu, kao i funkcionalnoj heterogenosti HDL subfrakcija (97). Brojne studije su pokazale recipročni odnos između kardiovaskularnog rizika i relativnog udela velikih HDL 2 čestica, kao i povezanost malih HDL 3 čestica sa KVB (97,98). U skladu s tim, potvrđena je veća prediktivna vrednost određivanja HDL subfrakcija u proceni rizika za KVB u odnosu na koncentraciju HDL-H (99). Pored opisanih promena u profilu subfrakcija, sadržaj HDL čestica takođe utiče na njihove funkcionalne osobine. Savremeno shvatanje suštine antiaterogenog delovanja ovog lipoproteina zasnovano je na činjenici da se svako narušavanje strukturnog integriteta HDL čestica odražava i na njihovu funkcionalnost, odnosno, uveden je termin „disfunkcionalnost HDL“ koji ukazuje na gubitak antiaterogene aktivnosti HDL (100). Pri tome, stepen disfunkcije HDL čestica može napredovati do paradoksalnog ispoljavanja proaterogenih osobina (101). Ukoliko je T1DM praćen povećanom aktivnošću CETP, raste sadržaj TG u jezgru HDL (102). CETP učestvuje u razmeni estara holesterola i TG između HDL i lipoproteina koji sadrže apoB. Fiziološki značaj ovog procesa je transport većeg dela holesterola u jetru putem LDL čestica koje se vezuju za LDLR, dok se u okviru reverznog transporta, manji deo holesterola doprema do hepatocita putem HDL čestica. Povećana aktivnost CETP rezultuje smanjenjem dijametra HDL čestica i povećanjem gustine usled povećanja sadržaja TG, čime postaju supstrat hepatične lipaze. Istovremeno delovanje CETP i hepatične lipaze, transformiše velike HDL čestice u male, gušće čestice sa smanjenom sposobnošću za transport estara holesterola u jetru i konačnu ekskreciju putem žuči (103). Dokazan je i povećan odnos sfingomijelin/lecitin u omotaču HDL čestica, čime se smanjuje fluidnost omotača, što može da bude uzrok smanjenog antioksidativnog kapaciteta ovog lipoproteina (104,105). Glikacija apolipoproteina A1 (apoA1) ometa reverzni transport holesterola, jer su takve čestice manje efektivne u procesu efluksa holesterola iz ćelija (85). Smanjena aktivnost paraoksonaze 1 (PON1), enzima vezanog za HDL, smanjuje antioksidativno dejstvo HDL čestica. PON1 sprečava akumulaciju lipidnih peroksida u oksidovanim LDL česticama, inaktivira bioaktivne oksidovane fosfolipide, stimuliše stvaranje azot monoksida aktivacijom endotelne azot monoksid-sintaze (eNOS) i povećava efluks akumuliranog holesterola iz makrofaga (106). Povećana izloženost LDL lipoproteina oksidaciji i umanjena ateroprotektivna sposobnost HDL višestruko povećava rizik za razvoj ateroskleroze. Antiinflamatorni kapacitet HDL čestica potiče delom od njegovih antioksidativnih sposobnosti, imajući u vidu da inhibira stvaranje ključnog hemokina za migraciju i infiltraciju monocita/makrofaga MCP-1 (eng. *monocyte chemoattractant protein-1*) čije stvaranje indukuje oksidovani LDL (107). Pored ovoga, pokazano je da HDL smanjuje inflamatorni odgovor endotelne ćelije na stimuluse citokina (npr. TNF- α , IL1), te smanjuje stvaranje adhezivnih molekula VCAM-1 (eng. *vascular cell adhesion molecule-1*), ICAM-1 (eng. *intercellular adhesion molecule-1*) i E-selektina (107). Dokazano je i direktno vezivanje HDL lipoproteina za T limfocite čime se sprečava kontakt sa makrofagama i posledična sinteza proinflamatornih citokina i hemokina (108). Međutim, akutna i hronična inflamacija u T1DM indukuju promene u HDL proteomu što rezultuje formiranjem čestice sa proinflamatornim delovanjem, bez ateroprotektivnog efekta (109). Sadržaj apoA1 u HDL se snižava tokom akutne inflamacije i zamenjuje se proteinom akutne faze, serumskim amiloidom A (SAA) (110). Kod pacijenata sa T1DM je pokazano značajno povećanje nivoa SAA u HDL 2 i HDL 3 subfrakcijama, u odnosu na zdrave osobe (111). Ove promene u HDL čestici se odnose, uglavnom, na njenu smanjenu sposobnost da indukuje efluks holesterola iz makrofaga tokom reverznog transporta holesterola (110). Novija istraživanja pokazuju sklonost HDL čestica koje sadrže SAA da se vezuju za proteoglikane intime medije, čime postaju podložne oksidaciji i enzimskoj modifikaciji, odnosno dobijaju proaterogena svojstva (112).

1.2. Proprotein konvertaza subtilisin keksin tip 9 (PCSK9)

Koncentracija LDL-H se smatra jednim od najvažnijih faktora za razvoj ateroskleroze i KVB (113). Postoji veliki broj dokaza da redukovanje nivoa LDL-H smanjuje morbiditet i mortalitet od KVB (114). Glavni put uklanjanja LDL čestica iz cirkulacije odvija se preko hepatičnih LDLR, te se ekspresija ovih receptora smatra ključnim činiocem koji određuje koncentraciju LDL-H u serumu. Transport LDL čestica u ćeliju se obavlja endocitozom. Ovaj proces podrazumeva internalizaciju kompleksa, liganda i receptora, kroz udubljenja (jamice), na ćelijskoj membrani, obložena klatrinom (proteinom koji učestvuje u formiranju vezikula manjih dimenzija), formiranje endozoma, fuziju sa lizozomima i degradaciju (116). LDLR prepoznaje ApoB-100 i ApoE koji se nalaze u spoljašnjem fosfolipidnom omotaču lipoproteinskih čestica, poput LDL i hilomikronskih i VLDL remnanta (116). LDLR je glikoprotein koji se sastoji od 839 amino kiselina i sadrži 5 domena: domen za vezivanje liganda (eng. *LDL type-A repeat domain*), domen koji je homologan strukturi prekursora epidermalnog faktora rasta (EGFPH, eng. *epidermal growth factor precursor homology domain*), domen sa O-vezanim oligosaharidima (eng. *O-linked glycosylation domain*), transmembranski domen (eng. *membrane spanning domain*) i citoplazmatski domen (eng. *cytoplasmic domain*) (Slika 3) (116,117).



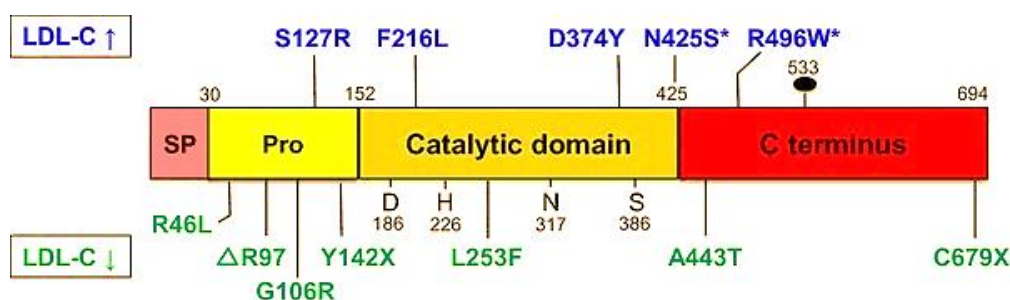
Slika 3. Shematski prikaz strukture LDLR. Preuzeto uz modifikacije iz: Lo Surdo P, Bottomley MJ, Calzetta A, Settembre EC, Cirillo A, Pandit S, et al. Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH. EMBO Rep. 2011;12:1300-5.

Domen za vezivanje liganda se sastoji od sedam homologih ponavljajućih sekvenci (L1-L7) sa visokim sadržajem cisteina. Svaka ponavljajuća sekvenca je stabilizovana sa tri disulfidne veze i jonom kalcijuma. LDL čestica se vezuje za sekvencu L5 na ovom domenu (118). ApoB-100 se vezuje jonskim vezama za receptor u stehiometrijskom odnosu, pri čemu u stvaranju ovog kompleksa učestvuju disulfidne veze između L4 i L5 i joni kalcijuma (118). EGFPH domen se sastoji od tri ponavljajuće sekvence, pri čemu su A i B sekvence povezane sa sekvencom C pomoću subdomena od 6 aminokiselinskih rezidua, tzv. β propelerom. β propeler zajedno sa (L4 i L5) sekvencama domena koji vezuje ligand ima ključnu ulogu u oslobađanju liganda u endozomu pri niskoj pH vrednosti, posle internalizacije LDLR-ligand kompleksa u unutrašnjost ćelije (116). Ligand vezujući i EGFPH domen zajedno sačinjavaju ektodomen LDLR. Domen sa O-vezanim oligosaharidima je bogat serinom, ima ulogu povezivanja ektodomena sa transmembranskim domenom, koji pričvršćuje LDLR za plazma membranu. Citoplazmatski domen omogućava pozicioniranje receptora u jamice obložene klatrinom na ćelijskoj površini u cilju brze internalizacije liganda vezanog za receptor. Tetramerna sekvenca (Asn-Pro-Val-Tyr) citoplazmatskog domena učestvuje u vezivanju kompleksa LDL:LDLR za adaptin (AP-2), protein koji je vezan za klatrinski omotač i regulatorni protein ARH (eng. *low-density lipoprotein receptor adapter protein 1*) (119). Posle interakcije ova tri proteina, formiraju se klatrinske vezikule koje se u unutrašnjosti ćelije oslobađaju klatrina, a vezikule postaju „rani“ endozomi (120,121). U ovim endozomima se LDL oslobađa kompleksa sa LDLR zahvaljujući niskoj pH vrednosti, a receptor se reciklira i vraća na površinu ćelije. Endozomi se potom stapaju sa

lizozomima u kojima pod uticajem kiselih hidrolaza dolazi do razgradnje LDL čestica na holesterol, fosfolipide i amino kiseline. (122). Recikliranje receptora se odvija pri niskoj pH vrednosti u vezikuli koja se odvaja od ranog endozoma, i u kojoj receptor ima zatvorenu formu zahvaljujući direktnom kontaktu između L4 i L5 i β propeler sekvence EGFPH domena. Pri neutralnoj pH vrednosti, na površini ćelije, LDLR dobija ponovo otvorenu, aktivnu formu (118). Ključna funkcija PCSK9 u homeostazi LDL-H je posttranslaciona regulacija broja LDLR na površini ćelije.

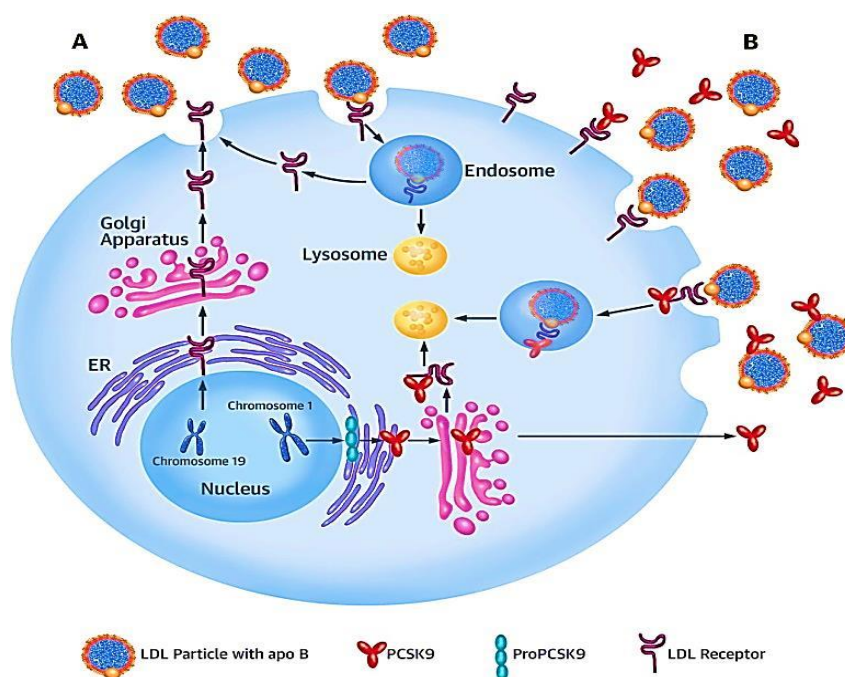
Otkriće uloge PCSK9 (eng. *proprotein convertase subtilisin kexin type 9*) u metabolizmu lipida, kroz interakciju sa LDLR, je pokrenulo veliki broj istraživanja u cilju razumevanja njegove korelacije sa koncentracijom LDL-H i regulacije dejstva ovog enzima *in vivo*. Identifikovanje nove mutacije, koja se nalazi u osnovi homozigotne forme familijarne hiperholesterolemije, je ujedno bila otkriće mehanizma delovanja i značaja PCSK9 u metabolizmu LDL čestica (123). Dalja istraživanja su utvrdila da nosioci tzv. *gain-of-function* mutacija gena za PCSK9 (onih koji povećavaju sintezu PCSK9) imaju različiti stepen hiperholesterolemije i suprotno, da nosioci tzv. *loss-of-function* mutacija imaju niske koncentracije LDL-H i značajno niži rizik od nastanka KVB (124). Dodatno, osobe sa homozigotnom *loss-of-function* mutacijom gena za PCSK9 koji nemaju merljive koncentracije ovog proteina u krvi, imaju ekstremno nisku koncentraciju LDL-H ($\approx 0,4$ mmol/L), nemaju zdravstvene smetnje i procenjen im je veoma nizak rizik za razvoj KVB (125). Ova naučna istraživanja, proširena u cilju razvoja novih terapijskih strategija, su dovela do otkrića inhibitora PCSK9 koji se danas preporučuju kao adjuvantna terapija za lečenje hiperholesterolemije kod pacijenata koji su rezistentni na statine, jer se njihovom primenom redukuje koncentracija LDL-H i do 60%, a tako i rizik za nastanak KVB (126,127).

PCSK9 je proprotein konvertaza, član superfamilije serin proteaza; sastoji se od 692 aminokiseline (relativna molekulska masa 72000), a gen koji kodira njegovu sintezu se nalazi na 1p32.3 hromozomu. Uglavnom se sintetiše i sekretuje iz hepatocita, a eksprimiraju ga u manjoj meri ćelije bubrega i centralnog nervnog sistema, enterociti tankog creva i β ćelije pankreasa. Sintetiše se u endoplazmatičnom retikulumu u obliku prekursora - pre-proPCSK9. Novosintetisani PCSK9 sadrži signalni peptid, prodomen, katalitički domen i C-terminalni domen, bogat histidinom i cisteinom (128). Nakon uklanjanja signalnog peptida, nastali pro-PCSK9 podleže autokatalitičkoj proteolizi N-terminalnog segmenta, odnosno prodomena. Prodomen ostaje nekovalentno vezan za C-terminalni domen čime omogućava formiranje prostorne konformacije proteina i istovremeno blokira njegovu katalitičku aktivnost (Slika 4).



Slika 4. Struktura PCSK9. Plavim su označena mesta gde su otkrivene *gain-of-function* mutacije, a zelenim *loss-of-function* mutacije. Preuzeto iz: Schulz R, Schlüter KD, Laufs U. *Molecular and cellular function of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*. *Basic Res Cardiol*. 2015;110:4.

PCSK9 svoju glavnu fiziološku ulogu ispoljava vezujući se za LDLR na površini ili unutar hepatocita. Vezivanje prekursorskih formi PCSK9 i LDLR se odvija još na endoplazmatskom retikulumu čime se obezbeđuje transport pro-LDLR do Goldži kompleksa i sazrevanje do zrele molekule. Pored funkcije šaperonske molekule, PCSK9 svojim vezivanjem za LDLR u Goldži kompleksu započinje intracelularni put degradacije receptora, čime sprečava njihov transport do ćelijske membrane (129). Sekretovani PCSK9 se vezuje za A sekvencu EGFPH domena LDLR, nastali kompleks se internalizuje klatrin-posredovanom endocitozom do endozoma-lizozoma. U lizozomima pri niskom pH, još jedna interakcija između ligand-vezujućeg domena na LDLR i C-terminalnog domena PCSK9, onemogućava da receptor postigne „zatvorenu“ prostornu konformaciju i da se reciklira, što rezultuje lizozomalnom degradacijom i receptora i enzima (128,129). Posledično, u cirkulaciji se, usled smanjenja broja LDLR, povećava koncentracija LDL-H (Slika 5).



Slika 5. Metabolizam LDLR i lipoproteina u prisustvu PCSK9. Preuzeto iz: Rosenson RS, Hegele RA, Fazio S, Cannon CP. The evolving future of PCSK9 inhibitors. J Am Coll Cardiol. 2018;72:314-29.

Cirkulišući PCSK9 može da formira dimere i trimere, čime se dodatno pojačava sposobnost ovog proteina da razgradi LDLR (131). Glavni put njegovog uklanjanja iz cirkulacije je vezivanje za LDLR. Odnos između broja LDLR i nivoa PCSK9 podrazumeva njihovu paralelnu ekspresiju i istovremenu degradaciju, ali istraživanja na eksperimentalnim modelima su pokazala da smanjenje hepaticnih LDLR dovodi do akumuliranja PCSK9 i dodatne razgradnje LDLR, ukazujući i na njihovu recipročnu interakciju (132). To su potvrdile i studije koje su pokazale da delimično ili potpuno odsustvo LDLR, u različitim oblicima familijarne hiperholesterolemije, povećava 2 puta koncentraciju PCSK9 i 4-5 puta koncentraciju LDL-H u krvi. S druge strane, niske koncentracije PCSK9, koje mogu da budu posledica *loss-of-function* mutacija ili terapije PCSK9 inhibitorima, rezultuju povećanim brojem LDLR na površini ćelije, usled njihove smanjene razgradnje, i posledičnim smanjenjem LDL-H (132). PCSK9 u plazmi podleže degradaciji furinom ili protein konvertazama PC5/6. Posle degradacije furinom, PCSK9 zadržava svoju aktivnost u smanjenom obimu (133).

Novije studije su pokazale da su lipoproteini plazme važni ekstracelularni činioci koji utiču na metabolizam PCSK9, te da LDL stvara komplekse sa PCSK9 u plazmi, modulirajući tako njegovu aktivnost. U humanoj plazmi je do 40% intaktnog PCSK9 vezano za LDL (134,135), za razliku od manjih formi, nastalih proteolitičkim dejstvom furina (136). Vezivanje za apoB koji ulazi u sastav VLDL je dokazano samo u hepatocitima, ali ne i u cirkulaciji, pretpostavlja se zbog sternih smetnji koje su posledica velikih dimenzija ove lipoproteinske čestice (135,137). Fiziološki i klinički značaj vezane forme PCSK9 još nije u potpunosti razjašnjen. Kliničke studije, zasnovane na lipoproteinskoj aferezi, su ukazale da bi aktivna forma PCSK9 mogla biti upravo ona koja se u cirkulaciji vezuje za LDL. To bi značilo da LDL čestice vezujući se za PCSK9 u cirkulaciji, kontrolišu njegovu sposobnost vezivanja za LDLR (136). S druge strane, *in vitro* istraživanja su pokazala da se vezivanjem za LDL, snižava afinitet PCSK9 prema LDLR, što dovodi do smanjene degradacije receptora (135). Pored LDLR, PCSK9 intereguje i sa drugim receptorima. Vezivanjem za VLDL-receptor (VLDLR) izaziva degradaciju receptora i smanjeno preuzimanje i akumulaciju lipida u adipocitima (138). Pokazano je da PCSK9 kontrolišu aktivnost LRP1 receptora (eng. *LDL related protein 1 receptor*) na površini hepatocita i makrofaga, čime modifikuje njegovu ulogu u inflamatornom odgovoru (139). Interakcija PCSK9 sa CD36 na hepatocitima i adipocitima dovodi do smanjene aktivnosti receptora i posledično smanjenog preuzimanja masnih kiselina iz cirkulacije i akumulacije TG (140).

Jedno od prvih zapažanja o potencijalnom uticaju PCSK9 na metabolizam TRL je proisteklo na osnovu rezultata koji su pokazali pozitivnu korelaciju između koncentracija PCSK9 i TG u plazmi kod dece, adolescenata i odraslih osoba (141,142). Korelacija PCSK9 i TG u plazmi je kasnije potvrđena brojnim istraživanjima u populacijama pacijenata sa poremećajima homeostaze glukoze, kao što su T1DM i T2DM (143,144), hroničnim bubrežnim bolestima (145) ili hiperlipidemijom tipa 3 (147).

Genetska i ispitivanja na eksperimentalnim modelima su ukazala na moguće mehanizme kojima PCSK9 reguliše metabolizam TRL, u koje se ubrajaju: povećano stvaranje apoB48 u intestinumu koje dovodi do pojačane sekrecije hilomikrona, smanjena autofagna degradacija i povećana sinteza apoB, povećana hepatična sekrecija VLDL i smanjeni broj, tj. gustina LDLR i drugih receptora (CD36, VLDLR, LRP1), što dovodi do smanjenog preuzimanja TRL u ćeliju. (147,148). Eksperimentalno je pokazano da PCSK9 značajno povećava sintezu apoB u enterocitima (149). Ovaj stimulatorni efekat PCSK9 na apoB sintezu je bio udružen sa povećanom transkripcijom gena koji učestvuju u biosintezi masnih kiselina i triglicerida i mikrozomalnog transportnog proteina (MTP) koji transportuje trigliceride (149). Uloga PCSK9 u metabolizmu triglicerida je pokazana u ispitivanju postprandijalne lipemije kod zdravih osoba, gde je koncentracija PCSK9 pokazala negativnu korelaciju sa brzinom uklanjanja radioaktivno obeleženog apoB48 iz plazme (150). Druga istraživanja su ukazala da PCSK9 sprečava degradaciju apoB u hepatocitima (137). U *in vitro* eksperimentima na hepatocitima, je uočena interakcija N-terminalnog kraja PCSK9 sa apoB koja je rezultovala povećanom sekrecijom VLDL čestica, što se pripisuje inhibiciji razgradnje apoB putem autofagozoma i lizozoma (137). Novije studije posebnu pažnju poklanjaju molekularnim mehanizmima kojima se može objasniti povezanost između sdLDL i PCSK9, koja je otkrivena kod pacijenata sa KVB (151). Jedno od mogućih objašnjenja je poreklo sdLDL od TRL, pre svega od VLDL čestica. Kao što je prethodno objašnjeno, sinteza VLDL čestica u hepatocitima je pozitivno regulisana dejstvom PCSK9 (137), što delom objašnjava posredni uticaj PCSK9 na povećano stvaranje sdLDL. Pored toga, smatra se da LDLR pod uticajem PCSK9 imaju različit afinitet i kapacitet za uklanjanje malih i velikih LDL čestica (152).

Ispitivanja povezanosti koncentracija PCSK9 i HDL-H su pokazala heterogene rezultate, počevši od studija koje su ukazale na pozitivnu korelaciju, do studija koje nisu utvrdile korelacije (153). Povećana koncentracija PCSK9 kod pojedinih *gain-of-function* mutacija nije imala značajan uticaj na koncentraciju HDL-H (154). Sa druge strane, terapija hiperholesterolemija PCSK9 inhibitorima je rezultovala značajnim povećanjem koncentracije HDL-H, verovatno usled smanjenja nivoa LDL-H i posledično smanjene razmene estara holesterola između ova dva lipoproteina, posredstvom CETP (153,155). Međutim, uticaj PCSK9 na profil HDL subfrakcija i funkcionalnost

HDL čestica još nije dovoljno ispitan. U studiji koja je ispitivala efekat PCSK9 inhibitora je utvrđeno da je povećanje HDL-H praćeno povećanjem čestica svih veličina i to najviše velikih HDL, a najmanje malih HDL čestica. To potvrđuje pretpostavku da smanjena aktivnost PCSK9 posledično smanjuje aktivnost CETP, ključnog regulatora distribucije, veličine i sastava HDL čestica (148,156).

1.2.1. Hepatična regulacija ekspresije PCSK9 gena

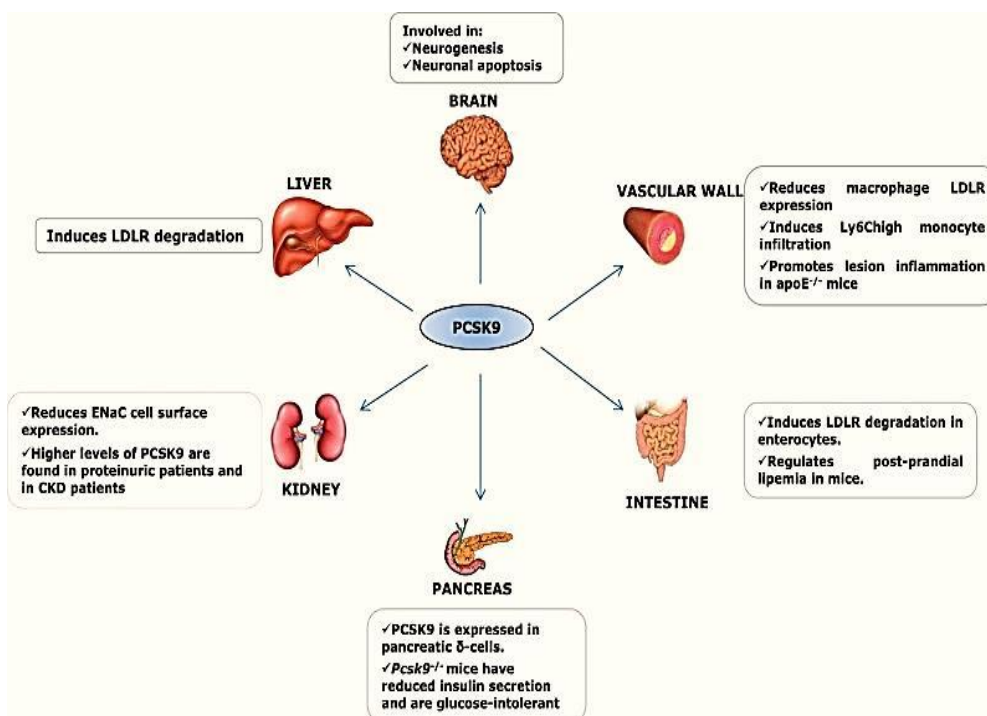
Ekspresija PCSK9 i LDLR u hepatocitima je pod uticajem brojnih transkripcionih faktora, od kojih su najvažniji sterol regulatorni element vezujući proteini 1 i 2 (SREBP, eng. *sterol regulatory element binding protein*). SREBP familija proteina ima tri izoforme koje regulišu homeostazu lipida kontrolišući ekspresiju gena uključenih u sintezu endogenog holesterola, masnih kiselina, TG i fosfolipida. SREBP-1c, pre svega, reguliše metaboličke puteve lipida i ugljenih hidrata koji su pod uticajem insulina, SREBP-1a reguliše sintezu masnih kiselina i holesterola, dok SREBP-2 prevashodno reguliše sintezu holesterola (157). SREBP-2 kod ljudi snažno suprimira ekspresiju gena za PCSK9 pri smanjenoj resorpciji holesterola, tj. u gladovanju, a stimuliše je posle unosa hrane (128). U istom smeru se odvija i regulacija LDLR pod uticajem SREBP-2, sa ciljem povećanja klirensa LDL-čestica iz krvi (158). Brojne studije su istraživale ćelijske mehanizme koji leže u osnovi insulinske kontrole ekspresije PCSK9, ostavljajući ovaj složeni mehanizam samo delimično razjašnjenim. Naime, insulin utiče na koncentraciju PCSK9 u krvi posredstvom transkripcionih faktora SREBP-1c i hepatičnog nuklearnog faktora-1 α (HNF-1 α). Insulin indukuje ekspresiju PCSK9 putem SREBP-1c, a inhibira ekspresiju PCSK9 supresijom HNF-1 α , te oba transkripciona faktora koordinisano regulišu transkripciju ovog proteina. SREBP-1c se vezuje za sterol regulatorni element (SRE) koji predstavlja DNK sekvencu u promotorskom regionu gena uključenih u metabolizam lipida i ugljenih hidrata (159). Ova sekvenca je prisutna u promotoru gena za PCSK9, a u neposrednoj blizini se nalazi i sekvenca za koju se vezuje HNF-1 α (160). Prema objavljenim istraživanjima, insulin deluje višestruko na regulaciju ekspresije PCSK9. Insulinom pokrenuta kaskada protein kinaza dovodi do fosforilacije i aktivacije SREBP-1c i posledično povećava ekspresiju PCSK9 (161). Međutim, insulin aktivira i drugi protein kinaznog puta suprotnog delovanja - mTORC1/protein kinaza δ (eng. *mammalian target of rapamycin complex 1*), što inaktivira HNF-1 α čime se smanjuje ekspresija PCSK9. Smatra se da je u normalnom fiziološkom statusu dominantan inhibicioni efekat insulina na PCSK9 ekspresiju (159,162).

Brojna istraživanja su sprovedena u cilju ispitivanja uticaja glukoze, insulina, insulinske rezistencije i deficita insulina na regulaciju PCSK9. Pokazano je da su nivoi PCSK9 sniženi do 58% kod zdravih osoba posle 36h gladovanja, odnosno u stanju niske koncentracije glukoze i insulina (158). *In vitro* studija na hepatocitima koji su kultivisani u rastvoru sa fiziološkom koncentracijom glukoze i hipertonom rastvorom glukoze, nisu pokazali razliku u ekspresiji PCSK9, ali uvođenje insulina u rastvor je rezultovalo povećanjem ekspresije PCSK9 (159). Rezultati studije na eksperimentalnim modelima koji su potpuno rezistentni na insulin, su pokazali da je 24h gladovanje kod njih izazvalo sniženje nivoa mRNA PCSK9 za 80%, dok je kod kontrolnih modela zabeleženo sniženje od 95%. U skladu sa ovim nalazima, autori su predložili 2 moguća mehanizma sniženja ekspresije PCSK9 u gladovanju: redukcija lučenja insulina i povećavanje lučenja glukagona (163). Suprotno ovome, klinička ispitivanja uticaja insulina na ekspresiju PCSK9 koja su sprovedena primenom metode euglikemijskog hiperinsulinemijskog klampa su dala kontradiktorne rezultate. Studija koja je uključila muškarce sa i bez T2DM nije prikazala razliku u koncentracijama PCSK9 u plazmi između ove dve grupe (164). Suprotno, u grupi gojaznih, postmenopauzalnih žena metodom euglikemijskog hiperinsulinemijskog klampa je posle 12h gladovanja zabeležen pad koncentracije PCSK9 od 15,4% (165). Takođe, uočen je inverzni odnos između osetljivosti na insulin i koncentracije PCSK9, jer su osobe sa najvećim vrednostima indeksa insulinske rezistencije i nivoima insulina na tašte, imale najviše koncentracije PCSK9 (165). Hronična hiperinsulinemija dovodi do

zmanjene ekspresije vitalnih medijatora insulinskog signalnog puta u jetri, što dovodi do insulinske rezistencije, ali istovremeno i do povećane ekspresije SREBP1-c, smanjenog inhibitory efekta insulina na HNF- α 1, te indukcije ekspresije PCSK9 (162,166). Uticaj potpunog nedostatka insulina je ispitivan na eksperimentalnim životinjama, gde je pokazano da T1DM indukovani streptozotocinom izaziva redukovanu ekspresiju LDLR zbog nedostatka insulina, ali uz očuvanje postojećih receptora, što se tumači smanjenom ekspresijom PCSK9, takođe zbog nedostatka insulina (167). Miao i saradnici su kod insulin-deficijentnih glodara utvrdili smanjenje nivoa iRNK PCSK9 za 88% u jetri i za 70% u plazmi (163). Uzimajući u obzir navedene eksperimente, očekuje se drastično smanjenje ekspresije PCSK9 i njegove koncentracije u cirkulaciji u insulin-deficijentnim stanjima kod ljudi, ali kontradiktorni rezultati studija o uticaju insulina govore u prilog kompleksnosti veze između PCSK9 i metabolizma glukoze i lipida, i kod zdravih i kod osoba sa poremećenom homeostazom glukoze (141,165,168).

1.2.2. Ekstrahepatična ekspresija PCSK9

PCSK9 se eksprimira u malim količinama i u drugim tkivima gde ima uticaja na različite fiziološke funkcije (Slika 6). Sa aspekta povezanosti sa metaboličkim poremećajima, ispitivana je ekspresija PCSK9 u pankreasu i utvrđeno je da se eksprimira uglavnom u δ ćelijama (169). Kod ljudi sa *loss-of-function* mutacijom PCSK9 su istraživanja pokazala različite rezultate, od normalne pankreasne funkcije do povećanja incidence T2DM i insuficijencije β ćelija. (170,171).



Slika 6. Ekspresija i uloge PCSK9 u ekstrahepatičnim tkivima. Preuzeto iz : Norata GD, Tavori H, Pirillo A, Fazio S, Catapano AL. Biology of proprotein convertase subtilisin kexin : beyond low density lipoprotein cholesterol lowering. *Cardiovasc Res.* 2016; 112:429-42.

Eksperimentalno je pokazano da se PCSK9 eksprimira i oslobađa sa glatkih mišićnih ćelija u humanim aterosklerotskim vaskularnim lezijama (172), kao i da visoke koncentracije oksidovanog LDL indukuju ekspresiju PCSK9 u endotelu krvnih sudova, što može da progredira u apoptozu ovih ćelija (173). Ovaj enzim je uključen u regulaciju LOX-1 *scavenger* receptora (eng. *lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*), koji predstavljaju najprominentnije receptore za oksidovani LDL na površini endotelnih ćelija, glatkih mišićnih ćelija i makrofaga u zidovima arterija (174). LOX-1 receptori učestvuju u mnogim patofiziološkim procesima, uključujući formiranje produkata oksidativnog stresa i inflamaciju. Oksidativni stres dovodi do pojačane oksidacije LDL, a oksidovane LDL čestice vezujući se za LOX-1 amplifikuju stvaranje produkata oksidativnog stresa i inflamatornu kaskadu (175). Pokazano je da inhibicija PCSK9 smanjuje ekspresiju LOX-1 na endotelu i glatkim mišićnim ćelijama, te dalje dovodi i do smanjene aktivacije proinflamatornih transkripcionih faktora poput NF- κ B (172,174).

Posebno je zanimljiva potencijalno direktna uloga PCSK9 u formiranju aterosklerotskih plakova. Ispitivanje lokalnog uticaja PCSK9 na stvaranje ateroma je pokazalo da ekspresija PCSK9 u makrofagama nema uticaja na širenje aterosklerotskog plaka ili dislipidemiju, ali dovodi do infiltracije Ly6c^{hi} monocita kod miševa (odgovaraju CD14⁺⁺ monocitima kod ljudi). Ovi monociti se smatraju markerima tkivne inflamacije jer su prekursori makrofaga proinflamatornog M1 fenotipa (176). Doprinos rasvetljavanju uticaja PCSK9 na proces aterogeneze je i studija koja je pokazala da je deficijencija PCSK9 povezana sa smanjenom koncentracijom citokina koji potiču iz makrofaga indukovanih oksidovanim LDL česticama (177).

1.2.3. PCSK9 u pedijatrijskoj populaciji sa T1DM

Opsežnom studijom, 2009. godine su prvi put utvrđene vrednosti PCSK9 u plazmi zdrave dece i adolescenata (141). Koncentracije su bile širokog raspona i sa značajnim varijacijama u odnosu na pol i uzrast. Tako su devetogodišnji dečaci, u odnosu na trinaestogodišnjake i šesnaestogodišnjake imali više vrednosti PCSK9, dok je suprotno utvrđeno za devojčice. Najviše koncentracije su zabeležene kod trinaestogodišnjih devojčica, značajno više nego kod prepubertetske grupe. Niže vrednosti PCSK9, kao i niže vrednosti ukupnog holesterola i LDL-H kod dečaka u svim starosnim grupama u odnosu na devojčice, su potvrdile uticaj hormonalne regulacije (141). Utvrđeno je da postoji značajna, pozitivna asocijacija između PCSK9 u plazmi i koncentracije glukoze, insulina i HOMA-IR indeksa (eng. *homeostasis model assessment of insulin resistance*). Nađena je i značajna, pozitivna korelacija između koncentracija PCSK9 i lipidnih markera kod zdrave dece: ukupnog holesterola, LDL-H i TG, kao i korelacija između PCSK9 i HDL-H i apoA1 (141). Korelacija između HDL-H i PCSK9 nije potvrđena kod odraslih ispitanika nezavisno od pola (178).

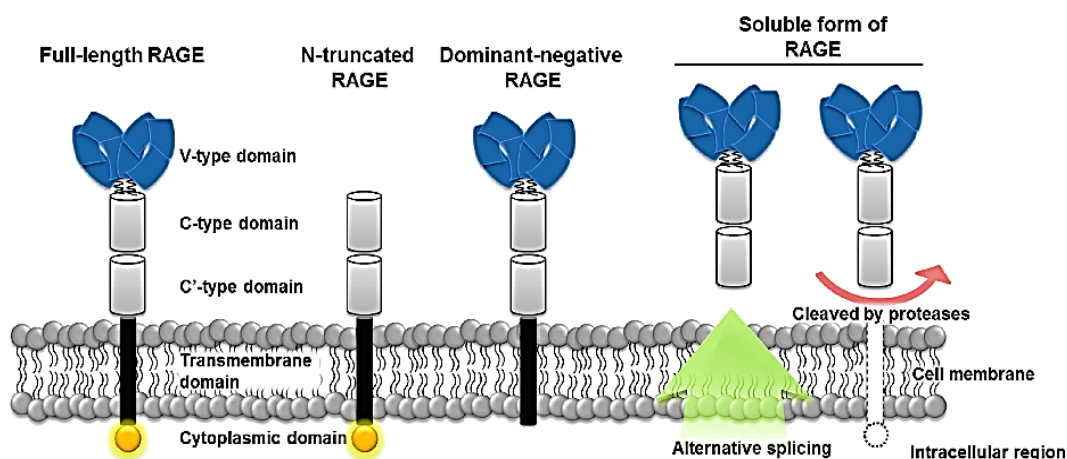
Koncentracije PCSK9 kod pedijatrijskih pacijenata sa T1DM su povišene u odnosu na zdrave vršnjake, kako je objavljeno 2017. godine, u prvom istraživanju ove tematike koje je obuhvatilo decu i adolescente sa T1DM (179). Istraživanja su ukazala na ulogu PCSK9 u nastanku dijabetesne dislipidemije kod pacijenata sa T2DM i metaboličkim sindromom (180,181), međutim, kod pacijenata sa T1DM je nedovoljno ispitana povezanost koncentracija PCSK9 i dislipidemije, naročito u pedijatrijskom uzrastu. Poseban značaj ima evaluacija uticaja postignute metaboličke kontrole i insulinske rezistencije kod pacijenata sa T1DM na koncentraciju PCSK9 kao potencijalnog ranog markera ateroskleroze.

1.3. Receptor za krajnje produkte uznapredovale glikacije (RAGE)

Osnove razvoja T1DM se nalaze u poremećaju imunskog i inflamatornog odgovora organizma. Pored toga, ateroskleroza kao nosilac značajnih kasnih komplikacija dijabetesa počiva na poremećajima imunoloških i inflamatornih mehanizama (182). U skladu sa tim, predmet ovog istraživanja je bilo i otkrivanje imunoloških markera vezanih za nastanak i razvoj T1DM i ranih markera za procenu rizika za nastanak ateroskleroze .

Novije studije su ukazale na ulogu RAGE u patogenezi T1DM. Otkriveno je da određeni polimorfizmi *AGER* gena (nalazi se na 6. hromozomu u okviru HLA klase III) koji kodira RAGE, utiču na rizik od pojave T1DM i dijabetesnih komplikacija (183). RAGE je eksprimiran na površini limfoidnih T (CD8⁺, CD4⁺, Treg, NKT) ćelija, B i plazma ćelija, zatim ćelija mijeloidne loze: monocita i makrofaga, dendritičnih ćelija i NK ćelija (184). Ekspresija RAGE je pokazana i na drugim neimunskim ćelijama tkiva u kojima ima važnu ulogu u razvoju komplikacija T1DM (pankreas, adipoznog tkiva, podocita bubrega, endotela krvnih sudova, retine, kardiomiocita) (184). RAGE je multiligandni receptor, a njegovi ligandi sa značajnom imunološkom ulogom su AGE, proteini familije S100-kalgranulini i HMGB-1 proteini (*eng. high mobility group protein box-1*). AGE su heterogena grupa jedinjenja nastala neenzimskom glikacijom proteina, lipida i nukleinskih kiselina i najviše proučavani ligandi RAGE, sa višestrukom ulogom u patogenezi T1DM i njegovih komplikacija (184,185).

RAGE je transmembranski receptor, relativne molekulske mase 55000, koji pripada superfamiliji imunoglobulina i javlja se u nekoliko izoformi. Njegov ekstracelularni region se sastoji od: N-terminalnog signalnog peptida, varijabilnog domena (V) za koji se vezuju ligandi i dva konstantna domena (C1 i C2). Ispod signalnog domena se nalaze transmembranski domen i C-terminalni citoplazmatski domen (Slika 7) (184). Solubilne izoforme RAGE (sRAGE) su heterogena grupa proteina plazme koji nastaju od RAGE proteolitičkim delovanjem ADAM10 i MMP 9 metaloproteinaza (186). U cirkulišući pul sRAGE spada i endogeni sekretorni RAGE (esRAGE), protein koji predstavlja alternativni transkript *AGER* gena, koji ne sadrži transmembranski i intracelularni domen, te se zbog toga sekretuje iz ćelije (187). sRAGE vezuju ligande RAGE u cirkulaciji, smanjujući tako njihovu raspoloživost za vezivanje za RAGE. Ove solubilne izoforme smanjuju RAGE signalizaciju jer se kompetitivno vezuju za njegove ligande, a smatra se da mogu imati imunomodulatornu ulogu i bez vezivanja za RAGE ligande (188).



Slika 7. Struktura i glavne izoforme RAGE. Preuzeto iz: Lee EJ, Park HJ. Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE), Its Ligands, and Soluble RAGE: Potential Biomarkers for Diagnosis and Therapeutic Targets for Human Renal Diseases. *Genomics Inform* 2013;11:224-9.

Signalna kaskada posredovana RAGE uključuje MAPK (eng. *mitogen activated protein kinase*) signalne puteve (JNK i JAK/STAT), kao i aktivaciju transkripcionog faktora NF- κ B što je u osnovi aktiviranja nekoliko proinflamatornih gena i ćelijskih fenotipskih promena, uključujući procese diferencijacije, proliferacije, migracije i apoptoze (184).

1.3.1. Uloga RAGE u razvoju T1DM

Multiligandna priroda RAGE i učestvovanje u inflamatornom odgovoru moglo bi ga označiti istaknutim faktorom u patogenezi T1DM, u oštećenju pankreasnih ali i drugih ciljnih tkiva zahvaćenim dijabetesnim komplikacijama. Iako su etiološki činioci T1DM i dalje predmet proučavanja, smatra se da (auto)imunski napad na β ćelije pankreasa dovodi do infiltracije leukocita i povećane ekspresije i oslobađanja S100/kalgranulina i HMBG1 (185). S100/kalgranulini su familija kalcijum-vezujućih proteina koji regulišu brojne ćelijske funkcije, uključujući homeostazu kalcijuma, ćelijski rast i sazrevanje i imunski odgovor, a koriste se kao biomarkeri hroničnih inflamatornih i autoimunskih bolesti (189). Pored intracelularnih funkcija, ovi proteini se sekretuju i vezuju za različite receptore, pri čemu se za RAGE vezuju S100B, S100A12, S100A6, S100P i S1008/9. Istraživanja su pokazala da su S100A8 (kalgranulin A), S100A9 (kalgranulin B) i S100A12 (kalgranulin C ili ekstracelularni RAGE-vezujući protein), visoko ekspimirani u aterosklerotskim plakovima (189). HMBG1 su nuklearni, nehistski proteini vezani za DNK, koji se kao posledica ćelijske stimulacije ili stresa oslobađaju iz ćelije, ili se ekspimiraju na ćelijskoj membrani (190). Istraživanja pokazuju da se HMBG1 aktivno sekretuju iz trombocita, monocita, makrofaga i dendritičnih ćelija (184), a pasivnim putem se oslobađaju iz nekrotičnih, ali ne iz apoptozom zahvaćenih ćelija, te da autokrinim ili parakrinim mehanizmom intereaguju sa RAGE (191). Uloga HMBG1 je dokazana u aterosklerotskim plakovima i ishemijskim oštećenjima krvnih sudova kod ljudi (192).

Istraživanja pokazuju da su posledice interakcija RAGE i njegovih liganada na ćelijama urođenog i stečenog imuniteta, kao i na β ćelijama i endotelnim ćelijama krvnih sudova pankreasa, povezane sa nastankom T1DM (184,185). Velika evropska populaciona studija je pokazala da su AGE nezavisni prediktori T1DM kod dece koja su imala pozitivna antitela na ćelije pankreasnih ostrvaca (ICA) (193). Vezivanje ovih liganada za RAGE na membranama β ćelija rezultuje

oštećenjem tkiva pankreasa, koje može da progredira do deficita insulina, hiperglikemije i, posledično, brze produkcije AGE. Masivno angažovanje RAGE, amplifikacija inflamatornog procesa uz dalje oslobađanje S100 i HMGB-1 liganada, stvara jedan zatvoreni krug hronične inflamacije i nemogućnost oporavka endokrine funkcije pankreasa (185). Inflamatorni proces posredovan interakcijom RAGE i njegovih liganada je prepoznat i u patogenezi mikro i makrovaskularnih oštećenja u dijabetesnim komplikacijama.

Brojne eksperimentalne studije sugerišu da interakcije AGE-RAGE na imunskim ćelijama promovišu njihovu polarizaciju u smeru proinflamatornog fenotipa. *In vitro* je pokazano da je polarizacija humanih, naivnih CD4⁺ ćelija u prisustvu AGE bila usmerena ka efektorskim, Th1 i Th17 ćelijama, uz pojačanu sintezu proinflamatornih citokina IFN- γ i IL-17 (194). Dendritične ćelije su antigen-prezentujuće ćelije koje utiču na polarizaciju naivnih T ćelija, koje odgovaraju na prezentovane antigene. Pretpostavlja se da AGE-RAGE interakcije na dendritičnim ćelijama utiču na polarizaciju, proliferaciju i funkciju T ćelija (195). Regulatorne T ćelije, čija je fiziološka uloga u suprimiranju autoimunosti, ekspimiraju RAGE, a pokazano je da ispoljavaju smanjenu supresivnu aktivnost kod pacijenata sa T1DM kada su u *in vitro* uslovima izložene delovanju AGE (194). Pokazano je da u stanju hronične inflamacije, interakcija HMGB1 i RAGE na površini Treg ćelija menja njihov supresivni kapacitet (196). Vezivanjem HMGB1 za RAGE receptore na M1 makrofagama pokreće se NF- κ B signalni put (197). Pored ovoga, vezivanje liganada za RAGE izaziva aktivaciju inflamazoma (inflamatorni proteinski kompleks u makrofagama) i posledičnu produkciju proinflamatornih medijatora HMGB1 i interleukina 1 β , citokina koji je uključen u patogenezu T1DM (198,199).

Transmigracija ćelija iz limfnog tkiva, kroz luminalne prostore krvnih sudova u pankreasna ostrvca je ključni proces u patogenezi T1DM. Kotrljanje i adhezija leukocita na endotelu je dinamičan proces kome sledi adhezija i transmigracija monocita (200). Opisana je ekspresija adhezionih molekula (VCAM-1, ICAM-1 i E-selektina) na endotelnim ćelijama, podstaknuta AGE-RAGE interakcijom (201). Dokumentovan je štetan uticaj modifikovanih proteina pod uticajem glikacije, na sekreciju insulina u β ćelijama. Oštećenje β ćelija putem oksidativnog stresa i apoptoze koji se aktiviraju kao posledica AGE-RAGE interakcije je opisano u β ćelijskim linijama i izolovanim pankreasnim ostrvcima (202).

1.3.2. Uloga RAGE u razvoju ateroskleroze

Ispitivanja mehanizama koji dovode do razvoja ateroskleroze u dijabetesu su dokazala veću ekspresiju RAGE u aterosklerotskim plakovima osoba sa dijabetesom, zatim ulogu aktiviranih RAGE receptora u formiranju plakova i u progresiji aterosklerotskih promena (203). Mehanizam aterogeneze u dijabetesu uključuje ekspresiju RAGE na mestima vaskularnih oštećenja, tj. na endotelnim ćelijama, u uslovima hiperglikemije i ubrzane produkcije AGE. Vezivanjem za RAGE, AGE pokreću NF- κ B signalni put, što dovodi do povećane produkcije proinflamatornih citokina, adhezionih molekula, protrombotskih i profibrotskih faktora, kao što je TGF- β 1 (204). U monocitima, interakcija AGE-RAGE stimuliše migraciju i povećava sintezu proinflamatornih citokina TNF- α , IL6 i IL1 β . Glatke mišićne ćelije reaguju povećanom migracijom i proliferacijom, povećanom sintezom reaktivnih jedinjenja kiseonika, te aktivacijom transkripcionih faktora NF- κ B i p21ras (204). Ispitivanja aktivacije RAGE kod eksperimentalnih modela sa indukovanim T1DM su dokazala da farmakološka blokada RAGE primenom rekombinantnog sRAGE sprečava razvoj vaskularne inflamacije i oksidativnog stresa, tj. mehanizme koji su povezani sa nastankom ateroskleroze u dijabetesu (204).

1.4. Transformišući faktor rasta $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)

TGF- $\beta 1$ je najzastupljenija TGF β izoforma koja pripada porodici citokina sa plejotropnom ulogom u brojnim fiziološkim i patofiziološkim procesima, kao što su imunski odgovor, embriogeneza i karcinogeneza (205). TGF- $\beta 1$ se sintetizira kao inaktivna molekula koja se sastoji od TGF- $\beta 1$ dimera vezanog za LAP protein (eng. *latency associated protein*). Inaktivni oblik TGF- $\beta 1$ se disulfidnim vezama vezuje sa LTBT, (eng. *latent TGF β binding protein*) u tzv. veliki latentni kompleks. Ovaj kompleks, vezan kovalentno, se skladišti u ekstracelularnom matriksu. Inaktivni oblik TGF- $\beta 1$ ne može da se vezuje za receptore, već to postaje moguće posle delovanja različitih faktora, uključujući integrine, proteaze, metaloproteinaze, reaktivna jedinjenja kiseonika, plazmin ili kiselu sredinu. Proteolizom LAP ili konformacionom promenom molekule, aktivirani TGF- $\beta 1$ se vezuje za receptorski tetramerni kompleks koji se sastoji od TGF β II i TGF β I receptora, koji pripadaju porodici enzimskih receptora serin/treonin kinaza (206). Aktivirani receptor TGF β I fosforiliše transkripcione faktore Smad2 i Smad3, što dovodi do njihove translokacije u jedro i to u kompleksu sa Smad4. Njihovo dalje vezivanje za regulatorne sekvence gena, u prisustvu transkripcionih kofaktora, dovodi do ekspresije ciljnih gena (207). Treba napomenuti da TGF β citokini ostvaruju dejstvo i nezavisno od Smad puteva, posredstvom mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK), PI3K kinaze i drugih (208).

TGF- $\beta 1$ ima ključnu ulogu u procesima proliferacije, diferencijacije, aktivacije ćelija, kao i u efektorskim funkcijama T ćelija, te je neophodan u održavanju imunske homeostaze, a posebno imunske tolerancije (209). TGF- $\beta 1$ učestvuje u diferencijaciji T ćelija u efektorske ili regulatorne podtipove, pri čemu njegovi efekti na diferencijaciju zavise od njegove koncentracije i prisutnih intracelularnih ili lokalnih faktora. U skladu sa tim, TGF- $\beta 1$ može da izazove pro- ili antiinflamatorni odgovor (210). TGF- $\beta 1$ reguliše diferencijaciju timusnih T ćelija u iNKT ćelije (eng. *invariant natural killer T cells*), CD8⁺ i regulatorne T ćelije. Pored toga, ovaj citokin svoje dejstvo imunomodulatora ostvaruje i kroz inhibiciju proliferacije visoko afinitetnih CD4⁺ i CD8⁺ u efektorske Th1, Th2 i citotoksične T limfocite (CTL). Svoje imunosupresivno dejstvo TGF- $\beta 1$ ostvaruje delovanjem na regulatorne T ćelije (CD4⁺Foxp3⁺ ili tTreg) koje nastaju u timusu, tako što učestvuje u kontroli njihovog preživljavanja na periferiji (211). Timusne regulatorne T ćelije su esencijalne za održavanje imunske tolerancije. Pored toga, TGF- $\beta 1$ je uključen, zajedno sa interleukinom 2 (IL-2) u diferencijaciju naivnih CD4⁺ ćelija u perifernu regulatornu T ćeliju koje nastaju u perifernim limfnim organima (212), zatim u Th17, Th9 i folikularne pomoćničke T ćelije (213). Na eksperimentalnim modelima je dokazano da TGF- $\beta 1$ indukuje Foxp3⁺ ekspresiju na CD4⁺ ćelijama čime se postiže njihov imunosupresivni efekat. Ekspanzija indukovanih Treg ćelija u pankreasnim ostrvcima pod dejstvom TGF- $\beta 1$ je pokazala protektivni efekat na razvoj dijabetesa (214). U prisustvu IL-6, TGF- $\beta 1$ pokreće diferencijaciju Th17 ćelija, posebne podvrste regulatornih ćelija, koje sekretuju antiinflamatorni IL-10. Dalje je pokazano da stimulacijom Th17 u prisustvu IL-23, a u nedostatku TGF- $\beta 1$, dolazi do njihove diferencijacije u efektorske Th17 koje sekretuju proinflamatorne IL-17, IL-21, IL-22 i hemokin GM-CSF (eng. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (213). Brojna istraživanja su ukazala na kompleksnu ulogu Th17 u patogenezi T1DM (215).

Za autoimunske bolesti je karakteristična infiltracija T ćelija, praćena taloženjem imunskih kompleksa u ciljnim organima, među koje spada i bubreg. Smatra se da je početno oštećenje tkiva, posredovano autoimunskim procesima, „okidač” za kasniju propagaciju inflamatornog procesa, koja se u krajnjim stadijumima završava fibrozom (216). Usled učestća TGF- $\beta 1$ u kompleksnim mehanizmima koji dovode do nastanka i progrediranja imunski-posredovanih inflamatornih oboljenja, postavljena je hipoteza o njegovoj dvostrukoj ulozi u autoimunskim bolestima. Naime, redukovana sinteza TGF- $\beta 1$ u imunskim ćelijama predisponira poremećaj imunske regulacije i razvoj autoimunosti, koji je praćen povećanom aktivnošću autoreaktivnih T ćelija i sintezom antitela, što vodi ka inflamaciji ciljnih tkiva. Posledična povećana lokalna sinteza antiinflamatornih citokina

podrazumeva i povećanu sintezu TGF- β 1, u cilju smanjenja inflamacije, ali i poremećaj u reparaciji tkiva, što indukuje stvaranje fibroznog tkiva i progrediranje do krajnjih stadijuma oštećenja zahvaćenih organa (217). Istraživanja su potvrdila ulogu TGF- β 1 u stvaranju i degradaciji ekstracelularnog matriksa i fibrozi tkiva (218).

TGF- β 1 se smatra antiaterogenim faktorom u ranim fazama ateroskleroze, zbog učešća u regulaciji homeostaze krvnih sudova (219). Disfunkcija endotela krvnih sudova ima ključnu ulogu u razvoju ateroskleroze i ogleda se u aberantnom odgovoru na hemijske i biomehaničke uticaje, tj. poremećajima sekrecije molekula koji regulišu adheziju imunskih ćelija, inflamaciju, tonus krvnog suda, protrombotske faktore, kao i proliferaciju i migraciju glatkih mišićnih ćelija (220). Endotelna disfunkcija počinje aktivacijom endotela, pre svega, kao posledice smanjenog protektivnog uticaja NO usled delovanja slobodnih kiseoničnih radikala, koji takođe aktiviraju i proinflamatorni transkripcioni faktor NF- κ B, glavni regulator inflamacije (220). TGF- β 1 kontroliše lokalnu inflamaciju stimulišući Treg ćelije, što suprimira proinflamatorno delovanje ćelija urođenog i stečenog imuniteta. U kulturi ćelija vaskularnog endotela je pokazano da TGF- β 1 suprimira ekspresiju adhezionih molekula kao i da sprečava njihovu proliferaciju i migraciju (221). Istraživanjem *in vitro* je pokazano da u kulturi makrofaga TGF- β 1 sprečava formiranje penastih ćelija (222). Studije su pokazale da smanjena aktivnost ovog citokina u zidovima krvnih sudova izaziva pojačanu leukocitnu infiltraciju, paralelno sa povećanom migracijom glatkih mišićnih ćelija, njihovom prenaplašenom proliferacijom, gubitkom diferencijacije i stvaranjem ekstracelularnog matriksa (223). Navedeni procesi glatkih mišićnih ćelija u zidovima krvnih sudova, uključujući i fenotipske promene, amplifikuju lokalnu inflamaciju, te se smatraju ključnim u formiranju i progrediranju aterosklerotskih plakova (224). *In vitro* istraživanja su pokazala da TGF- β 1 deluje na vaskularne glatke mišićne ćelije tako što u njima suprimira ekspresiju proinflamatornih faktora, kao što je IL-6 i preko Smad3 signalnih puteva (225).

U kasnijim stadijumima ateroskleroze TGF- β 1 može da funkcioniše i kao proaterogeni faktor. Najveći deo cirkulišućeg TGF- β 1 potiče iz aktiviranih trombocita koji se degranulišu posle adhezije na inflamacijom izmenjeni vaskularni endotel (226). TGF- β 1 indukuje sintezu mitogena kao što je PDGF (eng. *platelet-derived growth factor*) i faktor rasta vezivnog tkiva (CTGF, *connective tissue growth factor*), koji stimulišu glatke mišićne ćelije, što dovodi do povećane sinteze ekstracelularnog matriksa, odnosno sinteze više vrsta proteina koje ulaze u njegov sastav (kolagena, fibronektina i trombospondina) (226). U isto vreme, TGF- β 1 sprečava degradaciju matriksa indukujući sintezu PAI-1 i inhibitora matriks-metaloproteinaze, što dovodi do progresije plaka (227). Modulacijom imunskog odgovora pod dejstvom TGF- β 1, u ovoj fazi aterogeneze dolazi do infiltracije imunskih ćelija i fibroblasta u leziju i njihove diferencijacije u specijalizovane fagocite i miofibroblaste, koji izazivaju kontrakciju krvnog suda i njegovo progresivno sužavanje (stenoza), što se opisuje i kao negativno remodelovanje zida krvnog suda (228).

TGF- β 1 ima profibrotsko delovanje, koje je značajno u stabilizaciji plakova, jer formiranje fibroznog omotača štiti nastale plakove od rupture. Sniženje aktivnosti TGF- β 1 u kasnijim fazama ateroskleroze dovodi do uvećanja plaka. Takvi plakovi se karakterišu tankim fibroznim omotačem, te su zbog toga skloni rupturi. Kulminacija ovog procesa je izlivanje lipidnog sadržaja i prokoagulantnih činilaca iz plaka u cirkulaciju, što može da rezultuje pojavom okluzivne tromboze, infarkta ili moždanog udara (226). Eksperimentalno je pokazano da u aterosklerotskim vaskularnim bolestima postoji neosetljivost ćelija na TGF- β 1 signalizaciju, u smislu smanjene aktivacije citokina, nishodne regulacije receptora, Smad i drugih intracelularnih puteva (219).

TGF- β 1 je proučavan i kao medijator hipertrofičnih i prosklerotičnih promena u dijabetosnoj nefropatiji. U dijabetesu, hiperglikemija i oksidativni stres indukuju lokalnu ekspresiju TGF- β 1. *In vitro* studije su pokazale da je ekspresija TGF- β 1 povišena 3-10 puta u glomerulima i u cirkulaciji eksperimentalnih životinja, modela T1DM (229). Ovaj citokin podstiče ćelijsku hipertrofiju i akumulaciju ekstracelularnog matriksa u mezangijumu i intersticijumu, što smanjuje jačinu glomerularne filtracije (JGF) i može da progredira do hronične bubrežne insuficijencije. Povećana

ekspresija TGF- β 1 i povećana koncentracija samog proteina je uočena kod pacijenata sa oboljenjima bubrega praćenim fibrozom, uključujući dijabetesnu nefropatiju (230). Takođe, zabeležena je i povećana ekskrecija TGF- β 1 urinom, kod pacijenata sa incipijentnom proteinurijom (231). Određivanje koncentracije TGF- β 1 kod dece sa mikroangiopatskim komplikacijama T1DM, uključujući nefropatiju i retinopatiju, pokazalo je povezanost ovog parametra sa dužinom trajanja dijabetesa (232,233).

Novije studije su pokazale da TGF- β 1 učestvuje u regulaciji urinarne ekskrecije albumina na dva načina: povećava propustljivost glomerula i smanjuje reapsorpciju u proksimalnim tubulima. TGF- β 1 povećava ekskreciju vode, elektrolita i glukoze, i u fiziološkim uslovima i kod osoba sa dijabetesom (234). Početni stadijum dijabetesne nefropatije se karakteriše subkličičkim morfološkim promenama, povećanom ili normalnom JGF i mogućim povećanjem ekskrecije albumina urinom, koje može da bude u okviru preporučenih vrednosti (235). Poremećaj u izlučivanju albumina, pored poremećaja JGF i tubularne reapsorpcije, može biti praćen i dodatnim oštećenjem glomerula zbog povećanog opterećenja proteinima. Sledstveno oštećenje proksimalnih tubula vodi u intersticijalnu inflamaciju i postepeni gubitak bubrežnog tkiva. Gubitak filtracione jačine se reflektuje daljim povećanjem koncentracije albumina u urinu, koji se kod dijabetičara manifestuje postepenim prelazom iz normo- u mikro- i makroalbuminuriju (236). Mikroalbuminurija je dobro ustanovljeni marker endotelnog oštećenja i faktor rizika za proteinuriju, aterosklerozu i KVB za osobe sa dijabetesom i opštu populaciju (235). Smatra se da je mikroalbuminurija odraz poremećene vaskularne funkcije celog organizma, što leži u osnovi snažne prediktivne vrednosti ovog indikatora renalne disfunkcije za KVB (237). Smatra se da bi patofiziološki proces koji povezuje endotelnu disfunkciju, inflamaciju i mikroalbuminuriju mogao da bude ključni nosilac kardiovaskularnog rizika (238).

Pod patološkim laboratorijskim nalazom, kod dece i adolescenata sa T1DM, smatra se brzina izlučivanja albumina urinom $> 20 \mu\text{g}/\text{min}$, ali rano povećanje ekskrecije albumina, tj. granična vrednost koja ukazuje na rizik od albuminurije, proteinurije i moguće renalne disfunkcije, je već brzina izlučivanja albumina $> 7,5 \mu\text{g}/\text{min}$ (239,240). Utvrđena korelacija između zadebljanja arterija i ranog povećanja ekskrecije albumina ukazuje na povezanost prvih znaka dijabetesne nefropatije u T1DM i ateroskleroze, još u pedijatrijskom uzrastu (235).

1.5. Komorbiditeti T1DM i rizik za razvoj KVB

Istraživanja su pokazala da hronična inflamacija u autoimunskim oboljenjima i inflamacija u aterosklerozi imaju slične karakteristike. Pored toga, patofiziološki činioci poput dislipidemije i koagulopatije u autoimunske bolesti, potencijalno utiču na razvoj ateroskleroze i sledstveno povećanje kardiovaskularnog rizika (241). Dece i adolescenti oboleli od T1DM imaju povećani rizik za razvoj jedne ili više pridruženih autoimunskih bolesti (242). Ustanovljeno je da je zajednička genetska osnova T1DM i najčešćih komorbiditeta vezana, pre svega, za HLA haplotipove (243,244). Autoimunske tireoiditis (ATD) u dijabetesu ima najveću prevalencu (15-30%) i najčešće progredira u hipotireoidizam koji se manifestuje različitim stepenom gubitka funkcije tireoidne žlezde, a ređe u hipertireoidno stanje. Češće se javlja kod dece i odraslih sa T1DM nego u opštoj populaciji (242). Antitireoidna antitela, u koja se ubrajaju antitela na tireoidnu peroksidazu (antiTPO) i antitela na tireoglobulin (antiTg) se detektuju kod 20-30% obolelih od T1DM neposredno posle dijagnoze i pokazuju snažnu prediktivnu vrednost za ispoljavanje autoimunske tireoiditisa. Pokazano je da se antitireoidna antitela češće javljaju kod devojčica, kao i da su udružena sa starijim uzrastom, stadijumom puberteta, trajanjem dijabetesa i prisustvom autoantitela GADA i ZnT8 (245,246). Skrining obolelih od T1DM na antitireoidna antitela je obavezan u otkrivanju pacijenata sa komorbiditetom. Dijagnoza ATD se potvrđuje sniženim koncentracijama slobodnog T4 (fT4, eng. *free T4*) i povišenim koncentracijama tireostimulirajućeg hormona (TSH), kao i ultrazvučnom evaluacijom tireoidne žlezde. Subklinički hipotireoidizam se manifestuje povišenim koncentracijama TSH i normalnim nivoima fT4 (242,247). Dobro je poznato da adultni pacijenti sa hipotireozom imaju hiperholesterolemiju i značajno povećanje koncentracije LDL-H i apoB. Mehanizam razvoja hiperholesterolemije u hipotireozu se zasniva na smanjenom uklanjanju LDL čestica iz plazme, usled smanjenja broja i aktivnosti LDLR u jetri, čiju sintezu regulišu tireoidni hormoni (248). Aktivnosti CETP, hepatične i lipoproteinske lipaze su regulisane tireoidnim hormonom i u skladu sa tim, disfunkcija tireoidne žlezde utiče i na metabolizam TRL. Pored toga, tireoidni hormoni povećavaju sintezu žučnih kiselina, povećavaju sintezu holesterola i preuzimanje holesterola iz cirkulacije u ćelije jetre (248).

Potencijalni nezavisni uticaj subkliničkog i kliničkog hipotireoidizma u T1DM na razvoj ateroskleroze i KVB je nedovoljno ispitan u pedijatrijskoj populaciji. Povećanje ukupnog i LDL-H je dokazano kod dece sa subkliničkim hipotireoidizmom (249), kao i povećanje koncentracije TG i sniženje koncentracije HDL-H (250). Hipotireoidizam, bez supstitucione terapije je praćen pogoršanjem lipidnog profila (251). Metabolička kontrola najčešće nije ugrožena pridruženim ATD, ali je zabeležena pojava povećane osetljivosti na insulin i sledstvenih hipoglikemija (252).

Celijačna bolest (CB) je hronična autoimunska enteropatija i drugi po zastupljenosti (sa prevalencom do 10%) komorbiditet u T1DM (242,253). Prevalenca je 20 puta veća kod osoba sa T1DM u odnosu na opštu populaciju. Javlja se kod osoba sa genetskom predispozicijom, a izazvana je autoimunske reakcijom na konzumiranje glutena i sintezom autoantitela: antiendomizijalnih antitela (EmA), antiglijadinskih (AGA), antiretikulinskih (ARA) i antitela na tkivnu transglutaminazu (anti-tTG), kao i atrofijom intestinalnih mikrovila (253). Zajednički genetski faktor rizika za razvoj T1DM i CB je prisustvo genotipova HLA-DQ8 i HLA-DQ2. Mnogi vodiči sa preporukama za dijagnostikovanje CB preporučuju i ispitivanje prisustva ovih rizičnih genotipova, međutim, kako je većina obolelih od T1DM nosilac nekog od ovih genotipova, ta analiza nije adekvatna za otkrivanje CB kao komorbiditeta T1DM (242). Određivanje anti-tTG IgA i/ili anti-tTG IgG antitela je primarno u dijagnostici zbog otkrivanja ranih faza CB kod asimptomatskih pacijenata. Definitivna dijagnoza se postavlja biopsijom tankog creva (242,253). Istraživanja povezanosti markera ateroskleroze, sa pridruženim bolestima u T1DM kod pedijatrijskih pacijenata su malobrojna. Rezultati skorašnje populacione studije su pokazali da su koncentracije HDL-H značajno niže kod dece sa T1DM i udruženom CB u odnosu na one bez komorbiditeta. Posle praćenja od godinu dana i pridržavanja dijeta bez glutena, zabeleženo je povećanje koncentracija HDL-H, nezavisno od udela HbA_{1c}, tj.

postignute metaboličke kontrole (254). Povećanje koncentracije HDL-H i ukupnog holesterola i sniženje koncentracije CRP uz dijetu bez glutena, su pokazani i kod odraslih sa T1DM i pridruženom CB (255). Potencijalno objašnjenje povećanja koncentracije HDL-H i smanjenje koncentracije CRP je smanjenje inflamacije usled normalizacije intestinalne mukoze, kao posledice pridržavanja dijeta bez glutena (255). Ovi rezultati su takođe u skladu sa dokazima da je inflamacija ključni faktor u modifikaciji HDL proteoma i lipidoma, kao i funkcionalnosti HDL čestica (110). Doprinos u proceni rizika za aterosklerozu u dijabetesu koji je udružen sa CB, su dali podaci o većoj učestalosti rane ekskrecije albumina kod pedijatrijskih pacijenata sa CB. Ekskrecija albumina kod ove grupe pacijenata je bila povezana sa unošenjem glutena, dok metabolička kontrola nije imala uticaja (256). Znaci subkliničke ateroskleroze su potvrđeni kod odraslih dijabetičara sa CB, povećanom izmerenom cIMT i C-reaktivnim proteinom visoke osetljivosti (hsCRP, eng. *high sensitivity C reactive protein*) (257). Navedeni podaci o dodatnim faktorima rizika za aterosklerozu u T1DM u slučaju pridruženih autoimunskih bolesti pokazuju kompleksnost veze između autoimunosti, ateroskleroze i inflamacije.

2. Ciljevi istraživanja

Rani lipidni i inflamatorni markeri u krvi i genska ekspresija RAGE i TGF- β 1 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi su do sada nedovoljno ispitivani u populaciji pedijatrijskih pacijenata sa T1DM i zdrave dece, te su u skladu sa tim definisani sledeći ciljevi ove doktorske disertacije:

- Odrediti koncentracije PCSK9 u plazmi pacijenata sa T1DM i zdrave dece i utvrditi razlike.
- Ispitati uticaj metaboličke kontrole dijabetesa na koncentraciju PCSK9.
- Ispitati korelaciju koncentracija PCSK9 sa kliničkim i biohemijskim parametrima i raspodelom lipoproteinskih subfrakcija, u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole.
- Ispitati korelaciju koncentracija PCSK9 sa indeksom insulinske rezistencije u T1DM.
- Odrediti nivoe mRNA RAGE i TGF- β 1 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi kod pacijenata sa T1DM i zdrave dece i koncentracije oba proteina u plazmi u obe grupe ispitanika i utvrditi razlike.
- Utvrditi povezanost genske ekspresije RAGE i TGF- β 1 i njihove koncentracije sa laboratorijskim parametrima dislipidemije i inflamacije, markerima renalne i hepatične funkcije, kao i sa drugim indikatorima hroničnih komplikacija.
- Ispitati raspodelu lipoproteinskih subfrakcija kod zdrave dece i pacijenata sa T1DM, sa i bez koegzistirajuće autoimunske bolesti (celijačna bolest ili autoimunski tireoiditis), kao i indekse ateroskleroze, izvršiti poređenje i utvrditi razlike.
- Izvršiti poređenje kliničkih i laboratorijskih parametara od značaja za patogenezu ateroskleroze između pacijenata sa komorbiditetom i pacijenata bez komorbiditeta.

3. Materijal i metode

3.1. Ispitanici

Ovo istraživanje je dizajnirano kao studija preseka (eng. *cross-sectional study*) i u njemu je učestvovalo 342 ispitanika. Grupa ispitanika sa T1DM je formirana od 201 pacijenta Instituta za zdravstvenu zaštitu majku i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“, uzrasta od 6-19 godina (srednja vrednost $14,1 \pm 2,9$ godine), i to 96 devojčica i 105 dečaka. Dijagnoza T1DM je postavljena sledeći kriterijume nacionalnog i internacionalnih vodiča (2,258). Srednja vrednost dužine trajanja dijabetesa je iznosila $6,8 \pm 3,3$ godine (medijana: 7 godina; interkvartilni raspon : 4-8 godina). Pacijenti su primali intenzivnu insulinsku terapiju u formi multiplih insulinskih injekcija u toku dana (broj pacijenata $n=190$) ili terapiju kontinuiranom subkutanom insulinskom infuzijom, tj. primenom insulinske pumpe ($n=11$). Pacijenti nisu bili na terapiji hipolipemicima, niti su imali kliničke ili laboratorijske znake dijabetesnih komplikacija. Pre uzorkovanja krvi, u razgovoru sa pacijentom, prikupljeni su sledeći podaci o pacijentu: vreme početka i dužina trajanja bolesti, terapija insulinom i/ili drugim lekovima, način ishrane, podaci o fizičkoj aktivnosti, prisustvo pridružene autoimunske ili neke druge bolesti, porodična anamneza, konzumiranje duvana. Kliničkim pregledom i laboratorijskom evaluacijom su isključene akutne bolesti. Medicinske istorije bolesti i izveštaji o poslednjoj poseti endokrinologu i drugim specijalistima, uključenim u lečenje svih ispitanika, su bile dostupne za detaljan uvid u navedene podatke o pacijentu. Prema medicinskoj dokumentaciji, utvrđeno je da je, kao komorbiditet, ATD potvrđen kod 30 pacijenata (jednako zastupljen kod dečaka i devojčica), CB kod 15 pacijenata (6 devojčica i 9 dečaka). Dijagnoza pridružene autoimunske bolesti je ustanovljena ili pri dijagnostikovanju T1DM ($n=7$) ili posle dijagnostikovanja ($n=38$). Kod 50% ispitanika period koji je protekao od dijagnoze T1DM do dijagnoze komorbiditeta bio je kraći od 2 godine (medijana: 42 meseca; interkvartilni raspon: 23-62 meseca). Dijagnoza ATD je postavljena na osnovu koncentracije antiTPO >34 U/mL i nalaza kliničkog pregleda uz ultrazvučni nalaz tireoidne žlezde (259). Prisustvo celijačne bolesti je bilo suspektno ukoliko su vrednosti za IgA antitela na tkivnu transglutaminazu (anti-tTG IgA) i/ili IgG antitela na tkivnu transglutaminazu (anti-tTG IgG), bile veće od 10 U/L. Određivanje anti-tTg IgG antitela je urađeno zbog toga što 2-5% pacijenata može da ima deficijenciju IgA. Dijagnoza CB je bila potvrđena biopsijom tankog creva, sledeći kriterijume po Marsh-u (259). Pridržavanje režima bezglutenske dijeta je potvrđeno ukoliko su koncentracije navedenih anti-tTG antitela bile u okviru referentnih intervala (259).

Kontrolna grupa (KG) ispitanika je formirana od dece i adolescenata dobrovoljaca i onih koji su dolazili na kontrolni pregled i konsultacije u Republički centar za planiranje porodice Instituta. Grupu je činio 141 ispitanik, uzrasta 5-19 godina (srednja vrednost $13,9 \pm 3,4$ godine), i to 73 devojčice i 68 dečaka. Od svih ispitanika uzeti su podaci o porodičnoj anamnezi, eventualnom postojanju neke hronične ili akutne bolesti i terapiji, načinu ishrane, fizičkoj aktivnosti i konzumiranju duvana, kao i antropometrijske mere. Nijedan od ispitanika nije uzimao medikamentoznu terapiju, niti je testiran na prisustvo ATD ili CB, jer je utvrđeno da nemaju znake i simptome ovih bolesti.

Uzorci pacijenata i zdrave dece su sakupljeni od aprila 2015. do oktobra 2016. godine. Planiranje protokola i izvođenje studije je izvršeno sledeći principe Helsinške deklaracije. Roditelji ili staratelji ispitanika, kao i punoletni učesnici studije su dobili pisano obaveštenje o protokolu i ciljevima istraživanja, a svoj pristanak o učestvovanju su potvrdili potpisom. Etički komitet Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“, kao i Etički komitet Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu su dali odobrenje za izvođenje studije.

3.2. Laboratorijske analize

Venska krv je dobijena iz prednje kubitalne vene posle noćnog gladovanja. Analize biohemijskih parametara su urađene u Biohemijskoj laboratoriji Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ u Beogradu. Serumske koncentracije glukoze, ureje, mokraćne kiseline, ukupnog holesterola, HDL-H i TG su određene standardnim enzimskim metodama. Koncentracija LDL-H je izračunata Friedewald-ovom jednačinom. Koncentracija kreatinina u serumu je određena Jaffé-ovom metodom, a enzimске aktivnosti alanin-aminotransferaze (ALT), aspartat-aminotransferaze (AST) i γ -glutamil transferaze (γ -GT), standardnim metodama. Svi biohemijski parametri su određeni na biohemijskom analizatoru Hitachi 6000 Cobas c501 (Roche, Mannheim, Germany). Koncentracije TSH, fT_4 i antiTPO su određene metodom elektrohemiluminiscencije (ECLIA) na imunochemijskom analizatoru Cobas e411 (Roche, Mannheim, Germany). Za određivanje HbA_{1c} korišćen je turbidimetrijski inhibicioni imunotest (TINIA) za punu krv na biohemijskom analizatoru Hitachi 6000 Cobas c501 (Roche, Mannheim, Germany), a izračunata je i prosečna koncentracija glukoze eAG (eng. *estimated average glucose*) u krvi u poslednja 2-3 meseca, primenom sledeće jednačine (260):

Procenjena prosečna koncentracija glukoze (mmol/L) = $1.59 \times \text{HbA}_{1c} (\%) - 2.59$

Koncentracija albumina u urinu je izmerena u noćnom uzorku urina, tj. 12-časovnom urinu, nefelometrijskom metodom na BN proSpec[®] nefelometru (SIEMENS, Erlangen, Germany). Detekcioni limit metode je 3 mg/L, a rezultati su izraženi kao brzina ekskrecije albumina u $\mu\text{g}/\text{min}$. Jačina glomerularne filtracije (JGF) je izračunata prema Schwartz-ovoj formuli (261). Anti-tTG IgA i anti-tTG IgG antitela su određivana u plazmi ELISA (eng. *enzyme linked immunosorbent assay*) tehnikom, direktnim „sendvič“ testom na čvrstoj fazi. Anti-tTG IgA antitela su kvantifikovana AESKULISA[®] tTg-A New Generation testom (Aesculisa Diagnostics, Wendelsheim, Germany), tTG IgG antitela AESKULISA[®] tTG-G New Generation testom istog proizvođača. Detekcioni limit testova je 1 U/L, a linearnost od 0-300 U/L.

Koncentracije PCSK9, sRAGE i TGF- β 1 u plazmi su izmerene ELISA metodom u plazmi, direktnim „sendvič“ testom na čvrstoj fazi. U tu svrhu, upotrebljeni su Quantikine[®] ELISA - Human Proprotein Convertase 9/PCSK9, Duo Set Human RAGE i DuoSet TGF- β 1 imunotestovi (R&D systems, Wiesbaden, Germany). Ove analize su urađene u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

3.2.1. Određivanje koncentracije PCSK9 u plazmi

Za merenje koncentracije PCSK9 u plazmi upotrebljen je ELISA direktni „sendvič“ test (R&D systems, Wiesbaden, Germany), izveden prema uputstvu proizvođača. ELISA ploče su već obložene antitelima, tako da se standardi, uzorci plazme (razblaženi 20 puta) i kontrole aplikuju direktno u bazene, u koje je prethodno nanet diluent. Inkubacija traje 2 sata na sobnoj temperaturi. Posle ove inkubacije smatra se da su vezani svi proteinski antigeni u uzorku i standardu, ploča se ispira, u bazene se dodaje humani PCSK9 konjugat, odnosno poliklonsko detekciono antitelo, konjugovano sa peroksidazom. Posle još jedne dvočasovne inkubacije i ispiranja, dodaje se rastvor supstrata koji sadrži stabilizovani vodonik peroksid i hromogen-3,3',5,5'-tetrametilbenzidin. Peroksidaza u prisustvu vodonik-peroksida oksiduje hromogen do plavo obojenog 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin diimina. Posle 30 minuta sledi dodavanje rastvora koji sadrži sumpornu kiselinu, što zaustavlja reakciju, prevodeći plavo obojeni proizvod reakcije u žuti. Intenzitet boje koji se meri na 450 nm je proporcionalan koncentraciji PCSK9 u ispitivanom uzorku, a određuje na 450 nm. Minimalna koncentracija koja se može kvantifikovati iznosi 0,096 ng/mL.

3.2.2. Određivanje koncentracije sRAGE i TGF-β1 u plazmi

Za merenje koncentracija sRAGE i TGF-β1 u uzorcima plazme korišćen je direktni ELISA sendvič test (R&D systems, Wiesbaden, Germany), izveden prema uputstvu proizvođača. Početna faza testa podrazumeva oblaganje ELISA ploče antitelima za koje će se vezivati protein čija se koncentracija određuje u uzorku. Višak nevezanih antitela se ispira i blokira Tween® fosfatnim puferom. U bazene, ovako pripremljene ELISA ploče, se dodaju standardi, slepa proba (reagens razblažen rastvorom goveđeg albumina u PBS puferu) i uzorci plazme, koji se vezuju za imobilisana antitela na ploči. Uzorke za određivanje koncentracije TGF-β1 treba pripremiti za analiziranje aktivacijom, koja se postiže dodavanjem kiseline, a zatim baznog HEPES pufera, u cilju prevođenja latentnog TGF-β1 u imunoreaktivni, a potom razblažiti 20 puta. Nakon dvočasovne inkubacije, smatra se da su vezani svi proteinski antigeni u uzorku i standardu, ploča se ispira, i u bazene se dodaje detekciono anti-RAGE, tj. anti-TGF-β1 antitelo, obloženo biotinom. Posle još jedne dvočasovne inkubacije, nevezana detekciona antitela se ispiraju i dodaje kompleks streptavidin-peroksidaza, koji se vezuje za detekciono antitelo, usled visoko-afinitetne reakcije između biotina i streptavidina, tokom inkubacije od 20 minuta. Nakon ponovnog ispiranja, dodaje se supstrat, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin sa vodonik-peroksidom, koji peroksidaza u prisustvu vodonik-peroksida oksiduje do plavo obojenog 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin diimina. Reakcija se zaustavlja nakon 20 minuta dodatkom sumporne kiseline pri čemu dolazi do promene boje rastvora iz plave u žutu. Intenzitet boje koji se meri na 450 nm je proporcionalan koncentraciji sRAGE i TGF-β1 u ispitivanom uzorku. Izračunavanje rezultata se vrši sa standardne krive koja je odnos optičke gustine i koncentracije sRAGE i TGF-β1, izražene u pg/ml.

3.3. Antropometrijska merenja i evaluacija faktora kardiovaskularnog rizika

Svim učesnicima u istraživanju izmerena je visina, telesna masa, obim struka i kukova. Krvni pritisak je izmeren u sedećem položaju, na levoj ruci, korišćenjem živinog sfingomanometra. Hipertenzija je konstatovana ukoliko je sistolni i/ili dijastolni pritisak bio ≥ 95 . percentila, predhipertenzija ako su vrednosti vrednosti bile ≥ 90 . percentila, odnosno < 95 . percentila za uzrast ispitanika. Normalni pritisak je bio utvrđen vrednostima < 90 . percentila za uzrast ispitanika (262). Tokom detaljnog kliničkog pregleda je utvrđen stadijum pubertetskog razvoja Tanner-ovom standardizovanom metodom (263,264). Tanner-ov stadijum 1 odgovara prepubertetskoj fazi, stadijumi 2, 3 i 4 odgovaraju pubertetu, a stadijum 5 postpubertetskoj fazi. Za procenu statusa uhranjenosti izračunat je indeks telesne mase (ITM) koji je zatim konvertovan u percentilnu vrednost za odgovarajući uzrast i pol. Vrednost između 5. i 85. percentila je bio kriterijum za normalnu uhranjenost, vrednosti ≥ 85 . percentila, odnosno < 95 . percentila za prekomernu uhranjenost dok su vrednosti ≥ 95 . percentila bile kriterijum za gojaznost (265).

Prisustvo dislipidemije u grupi sa T1DM je, prema Nacionalnom vodiču za dijagnostikovanje i lečenje diabetes melitusa, konstatovano ukoliko su serumske koncentracije TG $> 1,69$ mmol/L, LDL-H $> 2,6$ mmol/L, koncentracije HDL-H za devojčice $< 1,29$ mmol/L a za dečake $< 1,15$ mmol/L (2). Kriterijumi za definisanje dislipidemije prema Nacionalnom vodiču za dijagnostikovanje i lečenje lipidskih poremećaja su: koncentracije LDL-C $> 3,36$ mmol/L, HDL-C $< 0,9$ mmol/L, koncentracija TG $> 1,7$ mmol/L (266). Postignuta metabolička kontrola je procenjena na osnovu koncentracije, tj. udela HbA_{1c}. Udeo HbA_{1c} $< 7,5\%$ je bio indikator optimalne metaboličke kontrole, $7,5\% \leq \text{HbA}_{1c} < 9\%$ indikator suboptimalne metaboličke kontrole, a HbA_{1c} $\geq 9\%$ se smatra lošom metaboličkom kontrolom (82). Granična vrednost od 20 μg/min je bio kriterijum za utvrđivanje mikroalbuminurije (239), a kao indikator ranog povećanja ekskrecije albumina primenjena je

granična vrednost $\geq 7,5 \mu\text{g}/\text{min}$ (240). Insulinska rezistencija kod pacijenata sa T1DM je određena preko eGDR (eng. *glucose disposal rate*). eGDR je izračunat prema formuli (94):

$$\text{eGDR}(\text{mg}/\text{kg}/\text{min}) = 21,158 + (-0,09 \cdot \text{OS}) + (-3,407 \cdot \text{HTA}) + (-0,551 \cdot \text{HbA}_{1c})$$

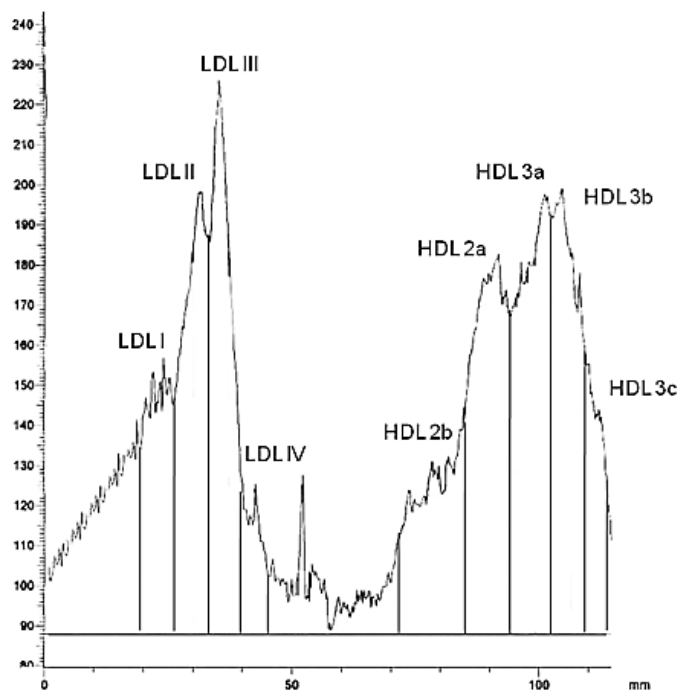
HTA- hipertenzija; prisutna hipertenzija = 1; nije prisutna hipertenzija = 0; OS - obim struka

Niže vrednosti eGDR su znak veće insulinske rezistencije (94).

3.4. Određivanje veličine i raspodele LDL i HDL subfrakcija

Razdvajanje i analiza LDL i HDL subfrakcija u plazmi pacijenata sa T1DM i zdrave dece urađeni su u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, primenom optimizovane metode koju su razvili Rainwater i saradnici (267,268). Princip razdvajanja se zasniva na razlikama u veličini i naelektrisanju lipoproteinskih subfrakcija, a primenjena je metoda vertikalne elektroforeze na gradijentu poliakrilamidnog gela. Struktura gela je sačinjena od segmenata poliakrilamida različitih koncentracija, koje se kreću u rasponu od 3% do 31%, što omogućava da se na istom gelu razdvoje subfrakcije oba lipoproteina. Sistem *Hoefler SE 675* (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria) je korišćen za pripremu gelova, a kada *Hoefler SE 600 Ruby* istog proizvođača za elektroforezu. Proces elektroforeze se odvija pri konstantnom naponu tokom 24 časa, na temperaturi od 8°C i pH 8,35, koju obezbeđuje Tris pufer. Za konstrukciju kalibracione krive, koja će služiti za određivanje dijametara LDL i HDL čestica, na svaki gel se nanose: standardizovana humana plazma, smeša proteinskih standarda odgovarajućih dijametara, u koje spadaju: albumin, laktat-dehidrogenaza, feritin i tireoglobulin (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria) i polistirenske mikročestice definisanog dijametara (Duke Scientific Corporation, Palo Alto, USA). Bojenje razdvojenih subfrakcija izvršeno je Sudan black B bojom (Merck, Darmstadt, Germany), a proteinskih standarda pomoću Coomassie brilliant blue G-250 boje (Sigma, St. Louis, MO, USA). Nakon završenog odbojavanja, u cilju uklanjanja nevezane boje, gelovi su skenirani i potom analizirani uz pomoć softvera *Image Quant* (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA).

Analiza raspodele subfrakcija podrazumeva da se na elektroforegramu najpre definišu oblasti u kojima su se razdvojile LDL, a potom i HDL čestice (Slika 8). Površine ispod pikova na elektroforegramu, koje potiču od četiri LDL subfrakcije, očitavaju se na osnovu raspona veličina čestica u sledećim intervalima: 27,2-28,5 nm (LDL I), 25,5-27,2 nm (LDL II), 24,2-25,5 nm (LDL III) i 22,0-24,2 nm (LDL IV). Na sličan način se očitavaju i površine ispod pikova za pet HDL subfrakcija, a rasponi dijametara čestica koji se koriste u tu svrhu su: 9,7-12,0 nm (HDL 2b), 8,8-9,7 nm (HDL 2a), 8,2-8,8 nm (HDL 3a), 7,8-8,2 nm (HDL 3b) i 7,2-7,8 nm (HDL 3c). Površine ispod krivih predstavljaju relativni udeo pojedinačnih subfrakcija i izražavaju se u %. Veličina LDL i HDL čestica se određuje iz standardne krive, koja predstavlja odnos prirodnog logaritma dijametara i relativne migracione daljine razdvojenih standarda, u odnosu na migracionu daljinu albumina.



Slika 8 . Prikaz profila LDL i HDL subfrakcija u uzorku, generisan u programu Image Quant

3.5. Određivanje genske ekspresije RAGE i TGF- β 1

3.5.1. Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi i RNK

Genska ekspresija RAGE i TGF- β 1, odnosno nivoi informacione RNK (iRNK) su analizirani na mononuklearnim ćelijama periferne krvi (PBMC, eng. *peripheral blood mononuclear cells*). PBMC su izolovane pomoću Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) gradijent-gela prema uputstvima proizvođača. Za izolaciju ukupne RNK iz PBMC je korišćena organska ekstrakcija TRIzol® reagensom (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Proces izolacije RNK pomoću ovog reagensa predstavlja modifikovanu metodu izolacije RNK koju su objavili Chomczynski i saradnici a optimizovana je u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta (269). Izolovana RNK je čuvana na -80°C u vodenom rastvoru PCR čistoće.

3.5.2. Određivanje koncentracije i ispitivanje kvaliteta izolovane RNK

Koncentracija ukupne RNK je izračunata tako što je apsorbanacija na 260 nm (maksimum apsorbanacije nukleinskih kiselina) pomnožena sa 40 (molarna apsorbanacija RNK na 260 nm) i faktorom razblaženja uzorka. U cilju procene čistoće, svakom uzorku su izmerene apsorbanacije na 230 nm, 280 nm i 320 nm i izračunati su odnosi A_{260}/A_{230} i A_{260}/A_{280} . Svi uzorci su zadovoljavali kriterijume za čistoću rastvora RNK i to: A_{260}/A_{230} je bio između 2,0-2,4 (tj. nije bilo značajne kontaminacije organskim rastvaračima korišćenim tokom ekstrakcije ukupne RNK); A_{260}/A_{280} je bio približno 2 (tj. nije bilo značajne kontaminacije proteinima iz PBMC), dok je A_{320} bio jednak 0 (tj.

nije bilo kontaminanata koje apsorbuju na 320 nm). Spektrofotometrijska merenja su izvršena na spektrofotometru UV-1800 UV-VIS spektrofotometar (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Integritet ukupne RNK je ispitan u svakom uzorku elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Elektroforetsko razdvajanje molekula RNK je vršeno horizontalnom *submarine* elektroforezom *Hofer Super Sub* (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria). Razdvojene frakcije su obojene rastvorom etidijum-bromida i posmatrane pod UV lampom u transiluminatoru *Macro Vue UVIs-20 Hofer* (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria). U svim uzorcima uočene su jasno vidljive i oštre frakcije na mestima koja odgovaraju 18S i 28S rRNK što predstavlja potvrdu da je integritet ukupne RNK, uključujući i iRNK očuvan.

3.5.3. Reverzna transkripcija

Prevođenje izolovane ukupne RNK u jednolančanu komplementarnu DNK (kDNK) procesom reverzne transkripcije (RT) je korak koji prethodi izvođenju kvantitativne lančane reakcije polimeraze (eng. *quantitative polymerase chain reaction* - qPCR, real time PCR) jer nosintetisana jednolančana kDNK predstavlja matricu za termostabilnu DNK polimerazu. Za reverznu transkripciju je korišćen *High Capacity DNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), a postupak je izveden prema protokolu proizvođača. Pre RT svi uzorci RNK su razblaženi vodom PCR čistoće na istu koncentraciju. Takođe, svako izvođenje RT je praćeno izvođenjem dve kontrolne reakcije:

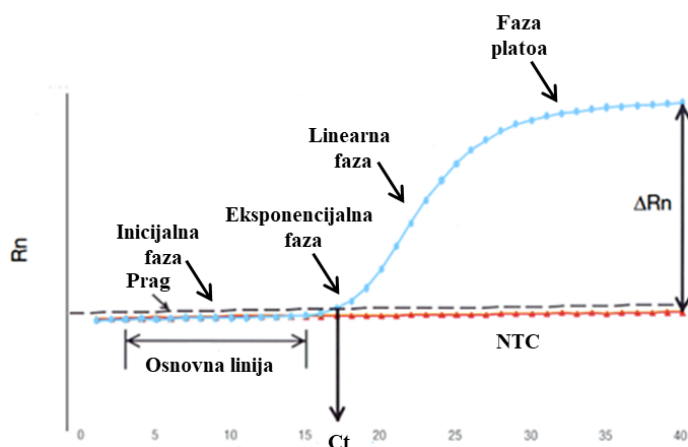
1) reakcijom bez enzima reverzne transkriptaze (eng. *Transcriptase free*, TF), ali sa svim ostalim komponentama RT čime se proveravala eventualna kontaminacija genomskom DNK (gDNK).

2) reakcijom bez uzorka RNK (eng. *no template reverse transcription* ili NTRT), a kojom se proveravalo da li je došlo do kontaminacije reagenasa i ukrštene kontaminacije prilikom nanošenja uzoraka na ploču.

3.5.4. Real-Time PCR (qPCR)

qPCR metoda se zasniva na lančanoj reakciji polimeraze u realnom vremenu. To je kvantitativna metoda za određivanje genske ekspresije, kojom se određuje količina akumuliranih amplikona, tj. specifičnih produkata u eksponencijalnoj fazi PCR reakcije, a ne u fazi platoa posle zadatog broja ciklusa. qPCR kombinuje konvencionalnu PCR amplifikaciju i fluorimetriju. Tokom qPCR se meri intenzitet fluorescentnog signala koji se emituje pri svakom ciklusu.

Tok qPCR se može podeliti na 4 faze: 1) Inicijalna faza koja predstavlja fluorescentnu pozadinu reakcije; 2) Eksponencijalna faza koju karakteriše eksponencijalni rast fluorescencije; 3) Linerana faza koju karakteriše linearni rast fluorescencije tj. linearni rast amplifikacije; 4) Faza platoa tokom koje se održava konstantna akumulacija PCR produkata uz malu promenu fluorescencije (Slika 9).



Slika 9. Grafički prikaz qPCR . Preuzeto iz uputstva proizvođača: Real-Time PCR Systems; Applied Biosystems 7900 HT Fast Real-Time PCR System and 7300/7500 Real-Time PCR Systems; Chemistry Guide; Applied biosystems 2005.

qPCR reakcija se odvija kroz određeni broj uzastopnih ciklusa, pri čemu svaki ciklus obuhvata korak denaturacije DNK kojoj sledi vezivanje prajmera i proba i elongacija matrice pomoću termostabilne DNK polimeraze. U početnim ciklusima PCR reakcije, fluorescencija se značajno ne menja, a to određuje opseg PCR ciklusa koji se zove bazalni nivo ili osnovna linija. Linija koja se nalazi iznad, paralelno osnovnoj liniji naziva se prag (eng. *threshold*). Ciklus praga (Ct, eng. *cycle threshold*) je ciklus u kome je prvi put uočen značajan porast fluorescencije tokom PCR u okviru ekspancijalne faze (Slika 9). Vrednost Ct je obrnuto proporcionalna količini, odnosno broju kopija ciljne sekvence u uzorku. Veći broj kopija ciljne sekvence podrazumeva manju vrednost Ct i obratno.

Dobijene količine kDNK koje odgovaraju količinama iRNK svih uzoraka za testirane gene su očitane sa relativne standardne krive. Za konstruisanje relativne standardne krive su pripremljena serijska dvostruka razblaženja standarda koji su dobijeni iz pula uzoraka nastalih mešanjem jednakih količina kDNK svih ispitanika. Napravljena su sledeća razblaženja standarda: 3 ng/μL, 1,5 ng/μL, 0,75 ng/μL, 0,375 ng/μL, 0,1875 ng/μL, 0,09375 ng/μL i urađena je qPCR metoda za testirane gene (RAGE i TGFβ1) i referentni gen (β-aktin) prema preporukama proizvođača (271). Svi uzorci su analizirani u triplikatu. Pored uzoraka na svaku ploču su postavljane i odgovarajuće kontrole (TF i NTRT), kao i negativna kontrola za qPCR (NTC, eng. *no template control*) u kojoj se nalaze sve komponente za PCR reakciju sem kDNK. Nakon završenog qPCR sa krive su očitane količine kDNK na osnovu Ct vrednosti svakog uzorka za svaki gen. Količine kDNK svih uzoraka u datim genima (RAGE i TGFβ1) su normalizovane za količine kDNK tih istih uzoraka u referentnom genu prema sledećim jednačinama:

$$\text{Genska ekspresija RAGE} = \text{kDNK RAGE} / \text{kDNK } \beta\text{-aktina}$$

$$\text{Genska ekspresija TGF}\beta\text{1} = \text{kDNK TGF}\beta\text{1} / \text{kDNK } \beta\text{-aktina}$$

Za ispitivane gene izabrani su komercijalni *TaqMan*® *Gene expression* testovi (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA): Hs00998133_m1 za TGFβ1 i Hs 00153957_m1 za RAGE i Hs99999903_m1 za β-aktin. RT i qPCR su izvedene na aparatu 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.6. Statistička analiza

Analiza kontinuiranih varijabli obuhvatila je proveru distribucije primenom Kolmogorov-Smirnov testa, izračunavanje mera centralne tendencije, rasipanja i konstrukciju histograma. Za kontinuirane promenljive koje su imale normalnu raspodelu predstavljene su srednje vrednosti \pm standardne devijacije, dok su promenljive koje nisu imale normalnu raspodelu prikazane kao medijane sa donjom i gornjom granicom interkvartilnih raspona. Kategoričke varijable su prikazane kao relativne ili apsolutne frekvence.

Za poređenje normalno distribuiranih podataka primenjeni su Student-ov t test i jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA), kojoj je sledio Tukey-Snedecor-ov *post hoc* test. Poređenje varijabli koje nemaju normalnu raspodelu je izvedeno korišćenjem *Mann-Whitney U* i *Kruskal-Wallis* testova. Kada je bilo neophodno, utvrđene razlike između grupa su dodatno korigovane za koncentracije drugih varijabli, uz pomoć parametarske (ANCOVA test) ili neparametarske analize kovarijanse (*Quade's test*). Za poređenje kategoričkih varijabli je upotrebljen Chi-kvadrat test. Ispitivanje korelacije između varijabli izvršeno je Sperman-ovom i Pearson-ovom korelacionom analizom. Multipla linearna regresiona analiza je primenjena za identifikaciju nezavisnih prediktora pojedinih varijabli, dok je analiza njihove prediktivne sposobnosti ispitivana binarnom logističkom regresionom analizom. U svim statističkim analizama *P* vrednost manja od 0,05 je smatrana značajnom. Statistička analiza je izvršena pomoću softvera IBM® SPSS®Statistics, version 22 (SpSS INC. Chicago, USA).

4. Rezultati

4.1. Demografske karakteristike ispitanika

Ovim istraživanjem obuhvaćen je 201 T1DM pacijent (105 dečaka i 96 devojčica), uzrasta $14,1 \pm 2,9$ godina i 141 zdrav ispitanik (68 dečaka i 73 devojčica) uzrasta $13,9 \pm 3,4$, koji su činili KG. Njihove demografske karakteristike su prikazane u tabeli 1.

Tabela 1. Demografske karakteristike ispitanika

Parametar	T1DM	KG	P
N	201	141	
Pol, n (%)			0,510
Dečaci	105 (52)	68 (48,2)	
Devojčice	96 (47,8)	73 (51,8)	
Uzrast, godine	$14,1 \pm 2,9$	$13,9 \pm 3,4$	0,384
Pubertetski status, %			
Prepubertet	12,4	14,9	0,806
Pubertet	36,3	35,5	
Postpubertet	51,2	49,6	
Sistolni pritisak, mm Hg #	110,0 (100,0-115,0)	110,0 (97,5-115,0)	0,692
Dijastolni pritisak, mm Hg #	65,0 (60,0-70,0)	65,0 (65,0-70,0)	0,720
ITM, kg/m ²	$20,4 \pm 3,3$	$20,8 \pm 4,2$	0,333
ITM z-skor #	0,3 (-0,3 – 1)	0,3 (-0,4 – 0,8)	0,366
Status uhranjenosti, %			
Normalna uhranjenost	84,5	77,3	0,673
Prekomerna uhranjenost	12	14,9	
Gojaznost	3,5	7,8	
Obim struka, cm	$74,1 \pm 8,7$	$72,9 \pm 13,9$	0,743
Obim kukova, cm	$92,0 \pm 11,1$	$90,3 \pm 12,1$	0,240

Kontinuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije i poređeni Student-ovim t testom. Kategorički podaci su prikazani kao apsolutne ili relativne frekvence i poređeni Chi-kvadrat testom.

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U testom.

U skladu sa dizajnom studije, pacijenti i kontrole se nisu razlikovali po polu i uzrastu. Takođe, grupe su bile homogene u pogledu stadijuma pubertetskog razvoja ispitanika. Nije bilo razlike u vrednostima sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska i ITM. U grupi pacijenata 12% ispitanika je imalo prekomernu telesnu masu, a 3,5% je bilo gojazno, dok je u KG bilo 14,9% ispitanika sa prekomernom telesnom masom i 7,8% gojaznih ($P=0,673$).

Kod polovine pacijenata bolest je trajala duže od 7 godina (prosečno $6,8 \pm 3,3$ godine), a 77,3% njih imalo je potvrđenu dijagnozu T1DM duže od 5 godina. Razvoj T1DM nastupio je oko sedme godine (medijana: 7 godina; interkvartilni raspon: 5-8 godina). Najveći broj pacijenata (94,5%) je primenjivao intenzivnu insulinsku terapiju u vidu multiplih injekcija. U ispitivanoj populaciji pacijenata sa T1DM, 45 ispitanika je imalo komorbiditete u vidu pridruženih autoimunskih bolesti. Kod 30 pacijenata (14,9%) je potvrđen autoimunski tireoiditis, a kod 15 pacijenata (7,5%) celijačna bolest.

Tabela 2. Kliničke karakteristike pacijenata sa T1DM

Parametar	Vrednost
Uzrast pri postavljanju dijagnoze, godine #	7,0 (4,0-10,0)
Trajanje dijabetesa, godine #	7,0 (5,0-8,0)
Trajanje dijabetesa >5 godina, %	77,3
Vid insulinske terapije, %	
Intenzivna insulinska terapija	94,5
Kontinuirana subkutana insulinska infuzija	5,5
Doza insulina, IU/kg/dan	1,01 (0,85-1,22)
Komorbiditeti, %	
Autoimunski tireoiditis	14,9
Celijačna bolest	7,5

Podaci su prikazani kao relativne frekvence i medijane (interkvartilni rasponi).

U tabeli 3 su prikazani parametri metaboličke kontrole kod pacijenata sa T1DM i u KG. Svim pacijentima je ispitana i urinarna ekskrecija albumina.

Tabela 3. Parametri metaboličke kontrole ispitanika

Parametar	T1DM	KG	P
Glukoza, mmol/L	$11,42 \pm 4,87$	$4,87 \pm 0,43$	<0,001
HbA _{1c} , % #	7,7 (7,1-8,5)	5,0 (4,9-5,2)	<0,001
Prosečna koncentracija glukoze (eAG), mmol/L	$10,14 \pm 4,30$	$5,39 \pm 0,37$	<0,001
Urinarna ekskrecija albumina, µg/min #	7,7 (7,1-8,5)	-	-
Urinarna ekskrecija albumina $\geq 7,5$ µg/min, %	18,9%	-	-

Kontinuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije i poređeni Student-ovim t testom. Kategorički podaci su prikazani kao relativne frekvence i poređeni Chi-kvadrat testom.

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U testom.

Kao što se moglo očekivati, pacijenti sa T1DM su imali značajno više koncentracije glukoze u serumu od ispitanika u KG. Udeo HbA_{1c} i prosečna koncentracija glukoze su takođe bili značajno viši kod pacijenata. Shodno dizajnu studije, u ispitivanoj populaciji pacijenata sa T1DM nije bilo ispitanika sa mikroalbuminurijom. Ipak, kod 38 pacijenata (18,9%) urinarna ekskrecija albumina je bila $\geq 7,5$ $\mu\text{g}/\text{min}$, što je rani znak njenog povećanja.

4.2. Lipidni markeri ispitanika

Svim učesnicima u istraživanju urađena je detaljna analiza lipidnog profila, koja je podrazumevala ispitivanje razlike u koncentracijama parametara lipidnog statusa u serumu, a potom i uporednu analizu veličine i raspodele LDL i HDL subfrakcija kod pacijenata sa T1DM i KG. Okosnicu ovog dela istraživanja činilo je ispitivanje koncentracije PCSK9.

4.2.1. Parametri serumskog lipidnog profila

Analiza parametara lipidnog statusa (Tabela 4) je pokazala da su koncentracije HDL-H kod pacijenata sa T1DM bile značajno više nego u KG. Koncentracije ukupnog i LDL-H, kao i koncentracije TG se nisu značajno razlikovale između posmatranih grupa.

Tabela 4. Parametri lipidnog statusa ispitanika

Parametar	T1DM	KG	P
Ukupan holesterol, mmol/L	4,20 \pm 0,89	4,17 \pm 0,65	0,727
TG, mmol/L #	0,72 (0,57-0,90)	0,75 (0,58-1,00)	0,354
LDL-H, mmol/L	2,17 \pm 0,75	2,31 \pm 0,60	0,067
HDL-H, mmol/L	1,65 \pm 0,38	1,47 \pm 0,33	<0,001
Non-HDL-H, mmol/L #	2,65 (2,25-3,15)	2,36 (2,03-2,96)	0,546

Podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije i poređeni Student-ovim t testom.

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U testom.

Dodatnom analizom smo utvrdili da učestalost hipertrigliceridemije ($\geq 1,7$ mmol/L) u grupi sa T1DM iznosi 3%, a u KG 3,5% ($\chi^2 = 0,779$; $P = 0,766$). Kod 23,2% pacijenata koncentracija LDL-H je bila viša od preporučenih vrednosti za T1DM ($> 2,6$ mmol/L). U KG povišene koncentracije LDL-H ($> 3,36$ mmol/L) imalo je 7,9% ispitanika, što je značajno niža učestalost nego u grupi sa T1DM ($\chi^2 = 13,828$; $P < 0,001$). Snižene koncentracije HDL-H ($< 0,9$ mmol/L) imalo je 3,5% ispitanika u KG. Koncentracije HDL-H niže od preporučenih za T1DM ($< 1,15$ mmol/L za dečake i $< 1,29$ mmol/L za devojčice) imalo je 10,6% pacijenata, što je bila značajno viša učestalost nego u KG ($\chi^2 = 5,737$; $P < 0,05$).

4.2.2. Profil LDL i HDL subfrakcija

Prosečne vrednosti dijametara LDL čestica i relativnih udela LDL subfrakcija kod pacijenata sa T1DM i u KG su prikazane u tabeli 5. U grupi sa T1DM veličina LDL čestica se kretala u rasponu od 22,56 do 28,43 nm, a kod 27,1% pacijenata čestice su bile izrazito malog dijametra (< 25,5 nm). Prosečan udeo malih, gustih LDL čestica kod pacijenata sa T1DM iznosio je 49%, pri čemu je najniža vrednost bila 21,8%, a najviša 77,5%. Kod svakog drugog pacijenta (54,8%) udeo malih, gustih LDL čestica je bio povišen (>50%). U poređenju sa KG, u grupi sa T1DM bio je značajno viši relativni udeo LDL I i LDL II subfrakcija, dok je relativni udeo malih, gustih LDL čestica bio značajno niži.

Tabela 5. Veličina i raspodela LDL subfrakcija u ispitivanim grupama

	T1DM	KG	P
LDL dijametar, nm	26,32 ± 1,23	26,31 ± 1,44	0,940
LDL dijametar < 25,5 nm, %	27,1	26,5	0,899
LDL subfrakcije, %			
LDL I	23,2 ± 7,5	18,5 ± 7,5	<0,001
LDL II	27,7 ± 5,7	25,3 ± 4,6	<0,001
LDL III	21,0 ± 4,8	20,9 ± 7,5	0,855
LDL IV	27,8 ± 7,9	29,0 ± 11,5	0,265
Male, guste LDL čestice, %	49,0 ± 7,5	54,5 ± 7,9	<0,001

Kontinuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni Student-ovim t testom. Kategorički podaci su prikazani kao relativne frekvence i poređeni Chi-kvadrat testom.

Prosečna veličina HDL čestica kod pacijenata je bila manja nego u KG, ali razlika nije bila statistički značajna ($P=0,060$). Uporedna analiza raspodele HDL subfrakcija kod pacijenata i kontrola je pokazala značajno sniženje relativnog udela HDL 2b, a porast udela malih HDL 3a, 3b i 3c subfrakcija kod pacijenata sa T1DM (Tabela 6). U skladu sa prethodnim, ukupan udeo malih HDL čestica bio je značajno viši u grupi sa T1DM, a kod 8% pacijenata je bio viši od 50%.

Tabela 6. Veličina i raspodela HDL subfrakcija u ispitivanim grupama

	T1DM	KG	P
HDL dijametar, nm	10,00 ± 0,92	10,21 ± 1,02	0,060
HDL dijametar < 8,8 nm, %	21,1	14,7	0,191
HDL subfrakcije:			
HDL 2b, %	41,8 ± 8,2	47,0 ± 8,8	<0,01
HDL 2a, %	20,8 ± 4,1	20,1 ± 6,9	0,272
HDL 3a, %	17,3 ± 4,6	14,4 ± 3,1	<0,001
HDL 3b, %	10,9 ± 4,9	8,2 ± 2,8	<0,001
HDL 3c, %	9,1 ± 4,3	8,2 ± 3,2	<0,05
Male HDL čestice, %	37,3, ± 8,4	30,9 ± 7,6	<0,001

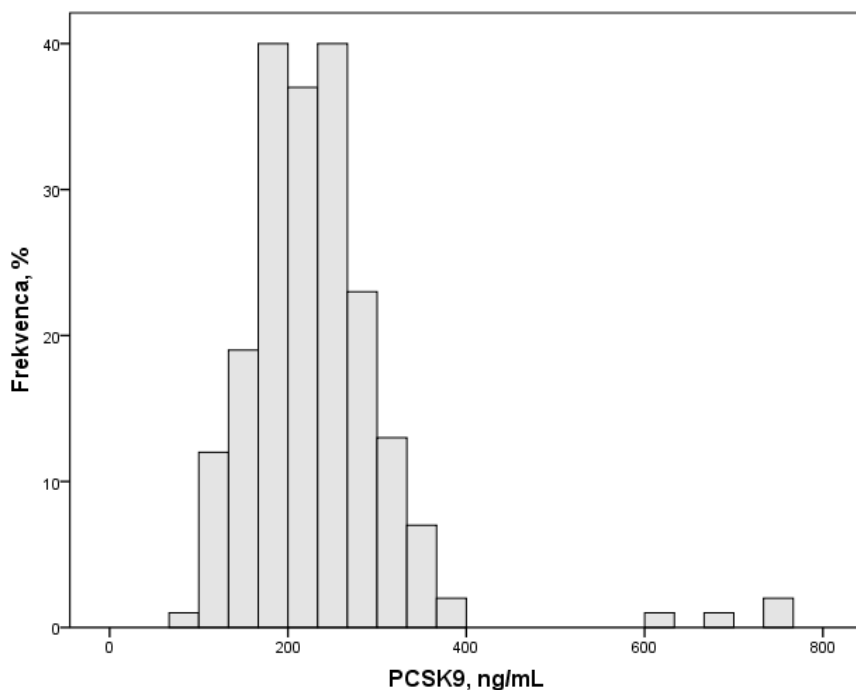
Kontinuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni Student-ovim t testom. Kategorički podaci su prikazani kao relativne frekvence i poređeni Chi-kvadrat testom.

4.2.3. Koncentracija PCSK9

Koncentracije PCSK9 kod pacijenata sa T1DM kretale su se u širokom rasponu od 98 ng/mL do 756 ng/mL. Prosečna koncentracija PCSK9 iznosila je $234,5 \pm 82,9$ nmol/L. Karakteristike raspodele koncentracija PCSK9 kod pacijenata sa T1DM su prikazane u tabeli 7, a sa slike 10 se može uočiti da je asimetrična (Kolmogorov-Smirnov $Z= 1,668$; $P<0,01$).

Tabela 7. Karakteristike raspodele koncentracija PCSK9 u T1DM

Parametar	Koncentracija, ng/mL
Srednja vrednost	234,5
Standardna devijacija	82,9
Medijana	221,5
Percentili	
P ₅	128,9
P ₂₅	187,0
P ₇₅	266,0
P ₉₅	355,1

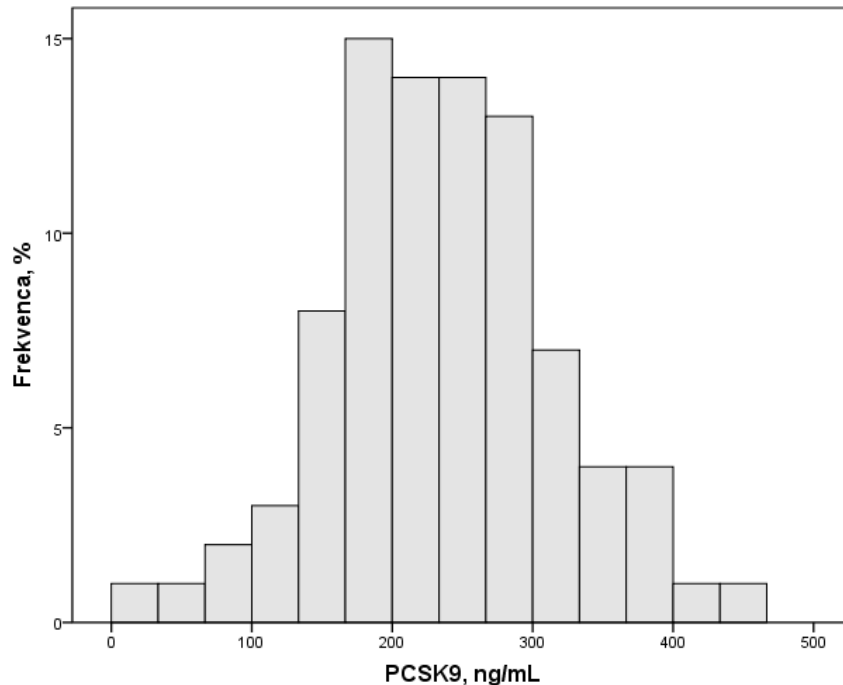


Slika 10. Histogram koncentracija PCSK9 u T1DM

U KG najniža koncentracija PCSK9 iznosila je 25 ng/mL, a najviša 434 ng/mL. Prosečna koncentracija PCSK9 u KG bila je $233,4 \pm 90,2$ nmol/L. U tabeli 8 su date karakteristike raspodele, a na slici 11 je prikazan histogram koncentracija PCSK9 u KG. Raspodela PCSK9 u KG je bila simetrična (Kolmogorov-Smirnov $Z= 0,510$; $P=0,957$).

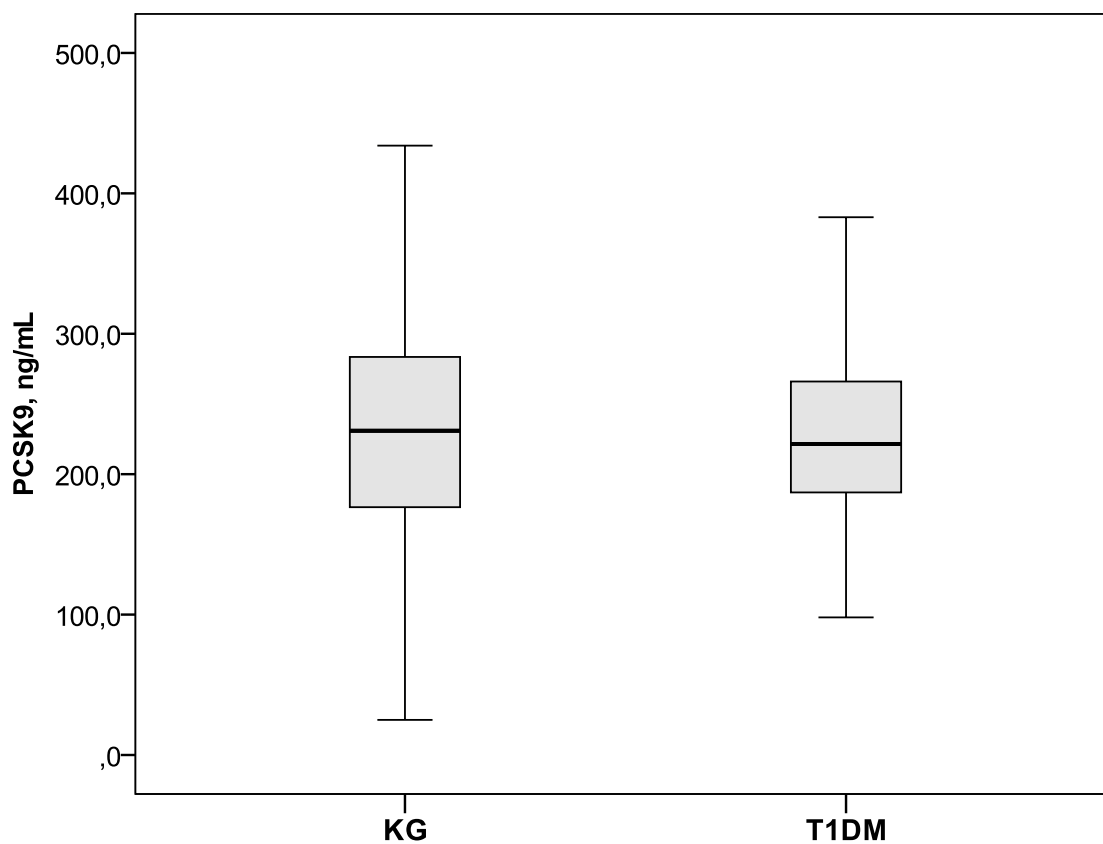
Tabela 8. Karakteristike raspodele koncentracija PCSK9 u KG

Parametar	Koncentracija, ng/mL
Srednja vrednost	233,4
Standardna devijacija	90,2
Medijana	231,0
Percentili	
P ₅	83,8
P ₂₅	176,5
P ₇₅	231,0
P ₉₅	283,5



Slika 11. Histogram koncentracija PCSK9 u KG

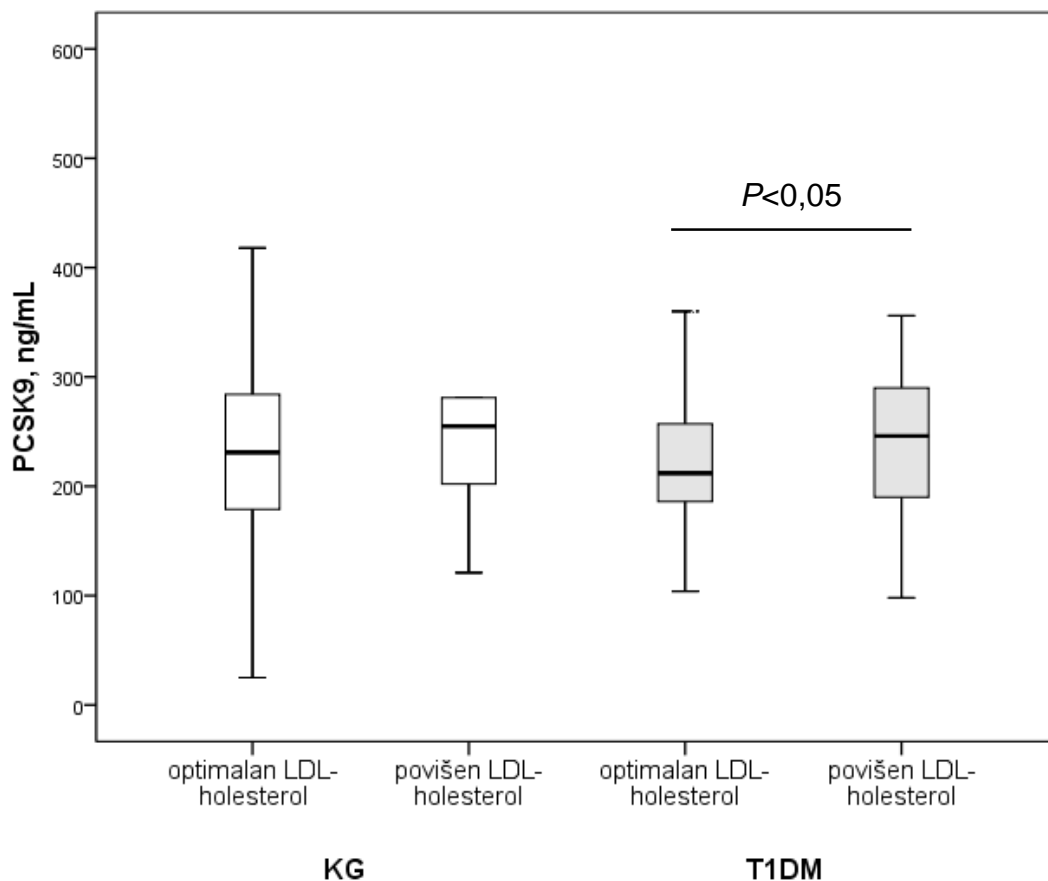
Na slici 12 je dat uporedni prikaz koncentracija PCSK9 kod pacijenata sa T1DM i u KG. Rezultati Mann-Whitney U testa su pokazali da nema značajne razlike u koncentracijama PCSK9 između pacijenata i kontrola ($P=0,546$).



Slika 12. Koncentracije PCSK9 u KG i kod pacijenata sa T1DM

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U testom.

Inicijalna analiza je zatim ponovljena nakon što su pacijenti i kontrole podeljeni u grupe sa optimalnim i povišenim koncentracijama LDL-H (Slika 13). Utvrdili smo da su koncentracije PCSK9 kod pacijenata sa T1DM koji istovremeno imaju i povišen LDL-H značajno više od koncentracija PCSK9 kod pacijenata sa preporučenim vrednostima LDL-H ($P<0,05$). U KG nije bilo razlike u koncentracijama PCSK9 između ispitanika sa optimalnim i povišenim koncentracijama LDL-H ($P=0,586$).



Slika 13. Koncentracije PCSK9 kod pacijenata i kontrola sa optimalnim i povišenim koncentracijama LDL-H

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U testom.

U tabeli 9 su prikazane koncentracije PCSK9 kod pacijenata i kontrola u zavisnosti od toga da li imaju optimalne ili povišene koncentracije LDL-H. Razlike u koncentracijama PCSK9 nisu bile statistički značajne kada su upoređene vrednosti kod pacijenata i kontrola sa optimalnim ($P=0,178$) i povišenim koncentracijama LDL-H ($P=0,875$).

Tabela 9. Koncentracije PCSK9 u zavisnosti od koncentracija LDL-H

	T1DM	KG	$P_{\text{između grupa}}$
LDL-H			
Optimalan	212,0 (186,0-257,0)	231,0 (179,0-284,0)	0,178
Povišen	246,0 (190,0-290,0)	255,0 (202,0-281,0)	0,875
$P_{\text{unutar grupe}}$	<0,05	0,586	

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U testom.

U nastavku je ispitivana korelacija koncentracija PCSK9 sa demografskim, kliničkim i laboratorijskim parametrima pacijenata sa T1DM i KG. Kao što se može videti u tabeli 10, koncentracije PCSK9 nisu korelirale sa ispitivanim demografskim i antropometrijskim karakteristikama pacijenata i kontrola.

Tabela 10. Korelacije PCSK9 sa demografskim karakteristikama pacijenata i kontrola

PCSK9, ng/mL	T1DM		KG	
	r	P	r	P
Uzrast, godine	-0,052	0,231	0,005	0,963
ITM, kg/m ²	-0,006	0,932	-0,040	0,710
Obim struka, cm	-0,042	0,584	0,080	0,475
Obim kukova, cm	-0,055	0,473	-0,046	0,678
Sistolni pritisak, mm Hg	-0,054	0,454	-0,049	0,793
Dijastolni pritisak, mm Hg	-0,047	0,518	-0,055	0,768

Prikazani su rezultati Sberman-ove korelacione analize.

Rezultati korelacione analize sa kliničkim i parametrima metaboličke kontrole su prikazani u tabeli 11. Utvrdili smo da u T1DM koncentracija PCSK9 značajno raste sa porastom udela HbA_{1c}, odnosno sa porastom prosečne koncentracije glukoze. U KG nije bilo značajnih korelacija.

Tabela 11. Korelacije PCSK9 sa kliničkim karakteristikama i parametrima metaboličke kontrole u T1DM i KG

PCSK9, ng/mL	T1DM		KG	
	r	P	r	P
Trajanje dijabetesa, godine	0,086	0,231	-	-
Doza insulina, IU/kg/dan	0,054	0,476	-	-
Glukoza, mmol/L	0,006	0,932	0,153	0,156
HbA _{1c} , %	0,351	<0,001	0,020	0,860
Prosečna koncentracija glukoze (eAG), mmol/L	0,331	<0,001	0,030	0,786
Urinarna ekskrecija albumina, µg/min	-0,068	0,388	-	-

Prikazani su rezultati Sperman-ove korelacione analize.

Tabela 12 prikazuje rezultate analize korelacija između koncentracije PCSK9 i parametara lipidnog profila pacijenata sa T1DM i KG. Koncentracije PCSK9 kod pacijenata sa T1DM su bile u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama ukupnog holesterola i TG. Očekivano, u grupi sa T1DM koncentracije PCSK9 su pozitivno korelirale sa koncentracijama LDL-H, kao i sa koncentracijama non-HDL-H. Sa druge strane, PCSK9 nije korelirao sa parametrima lipidnog statusa u KG.

Tabela 12. Korelacije PCSK9 sa parametrima lipidnog statusa u T1DM i KG

PCSK9, ng/mL	T1DM		KG	
	r	P	r	P
Ukupan holesterol, mmol/L	0,252	<0,001	0,129	0,234
TG, mmol/L	0,271	<0,001	0,180	0,094
LDL-H, mmol/L	0,159	<0,05	0,149	0,172
HDL-H, mmol/L	0,058	0,418	0,056	0,608
Non-HDL-H, mmol/L	0,212	<0,01	0,145	0,179

Prikazani su rezultati Sperman-ove korelacione analize.

Koncentracije PCSK9 su pozitivno korelirale sa veličinom LDL čestica, a negativno sa relativnim udelom malih LDL IV subfrakcija u plazmi pacijenata sa T1DM. U KG nismo utvrdili povezanost koncentracije PCSK9 sa veličinom i relativnim udelima LDL subfrakcija (Tabela 13).

Tabela 13. Korelacije PCSK9 sa veličinom i raspodelom LDL subfrakcija u T1DM i KG

PCSK9, ng/mL	T1DM		KG	
	r	P	r	P
LDL dijametar, nm	0,147	<0,05	0,022	0,841
LDL I, %	0,093	0,192	-0,151	0,164
LDL II, %	-0,002	0,980	-0,058	0,594
LDL III, %	-0,064	0,374	0,052	0,632
LDL IV, %	-0,173	<0,05	0,055	0,616
Male, guste LDL, %	-0,120	0,092	0,109	0,319

Prikazani su rezultati Sperman-ove korelacione analize.

Naposletku smo analizirali korelacije PCSK9 sa veličinom i raspodelom HDL subfrakcija (Tabela 14). Utvrdili smo značajnu inverznu korelaciju HDL dijametara, a pozitivnu korelaciju relativnih udela HDL 3a čestica sa koncentracijama PCSK9 kod pacijenata sa T1DM. Ni ovoga puta nismo dokazali značajne korelacije u KG.

Tabela 14. Korelacije PCSK9 sa veličinom i raspodelom HDL subfrakcija u T1DM i KG

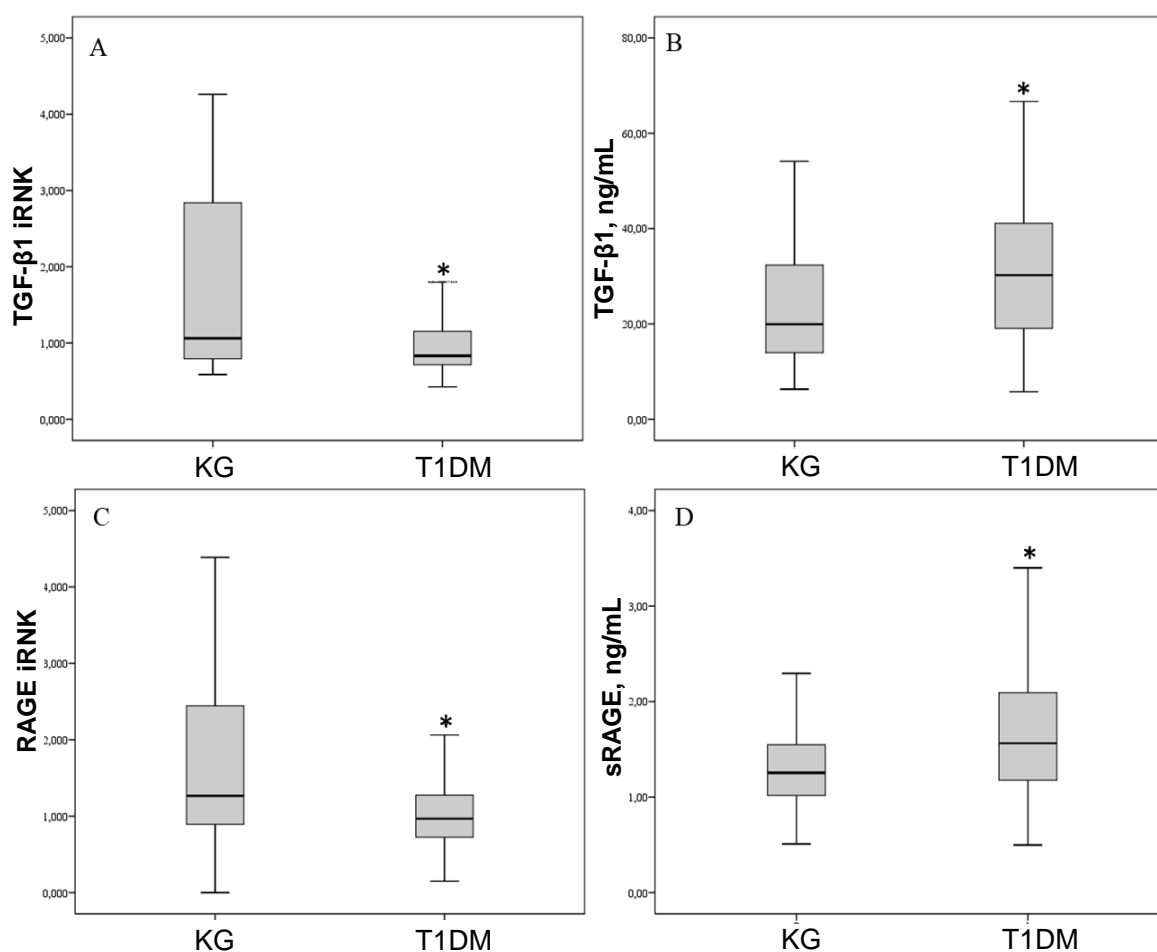
PCSK9, ng/mL	T1DM		KG	
	r	P	r	P
HDL dijametar, nm	-0,143	<0,05	-0,055	0,612
HDL 2b, %	-0,174	0,15	-0,164	0,131
HDL 2a, %	-0,085	0,235	0,165	0,126
HDL 3a, %	0,153	<0,05	0,159	0,143
HDL 3b, %	0,081	0,258	0,095	0,384
HDL 3c, %	0,045	0,530	-0,060	0,585

Prikazani su rezultati Sperman-ove korelacione analize.

4.3. Inflamatorni markeri

Analiza genske ekspresije u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i koncentracija inflamatornih markera u plazmi pacijenata sa T1DM i KG je izvršena nakon što su iz originalnog uzorka isključeni pacijenti koji su imali druge pridružene autoimunske bolesti (n=45), zbog njihovog učinka na inflamatorni status, koji prevazilazi efekte osnovne bolesti.

Na slici 14 su prikazani nivoi iRNK za TGF- β 1 i RAGE (Slika 14, pod A i C) u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i koncentracije TGF- β 1 i sRAGE u plazmi pacijenata sa T1DM i KG (Slika 14, pod B i D).



Slika 14. Genska ekspresija u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i koncentracija inflamatornih markera u plazmi pacijenata sa T1DM i KG: A) Normalizovani nivoi TGF- β 1 iRNK; B) Koncentracije TGF- β 1; C) Normalizovani nivoi RAGE iRNK; D) Koncentracije sRAGE.

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U testom: *P<0,01.

4.3.1. Genska ekspresija inflamatornih markera u mononuklearnim ćelijama

U tabeli 15 je dat uporedni prikaz nivoa genske ekspresije TGF- β 1 i RAGE u mononuklearnim ćelijama periferne krvi kod pacijenata sa T1DM i u KG.

Tabela 15. Genska ekspresija TGF- β 1 i RAGE u ispitivanim grupama

Parametar	T1DM	KG	P
TGF- β 1 iRNK	0,83 (0,71-1,13)	1,06 (0,79-2,78)	<0,001
RAGE iRNK	0,95 (0,72-1,27)	1,16 (0,88-2,38)	<0,001

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U testom.

Rezultati su pokazali da su nivoi iRNK TGF- β 1 i RAGE u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa T1DM značajno niži nego u KG (Tabela 15, Slika 14 pod A i C).

4.3.2. Koncentracije inflamatornih markera u plazmi

Tabela 16 prikazuje koncentracije markera inflamacije u plazmi pacijenata sa T1DM i KG. Pacijenti su imali statistički značajno više koncentracije TGF- β 1 i sRAGE nego ispitanici u KG. Takođe, u grupi pacijenata bila je značajno viša i koncentracija hsCRP-a.

Tabela 16. Koncentracije inflamatornih markera u ispitivanim grupama

Parametar	T1DM	KG	P
hsCRP, mg/L	0,70 (0,30-1,70)	0,40 (0,20-0,90)	<0,01
TGF- β 1, ng/mL	29,63 (19,00-41,14)	18,51 (13,23-31,54)	<0,01
sRAGE, ng/mL	1,57 (1,18-2,10)	1,26 (1,03-1,56)	<0,001

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U testom.

Zatim je analizirana korelacija između genske ekspresije i koncentracija TGF- β 1 i RAGE i demografskih, kliničkih i laboratorijskih parametra u grupi pacijenata sa T1DM i KG (Tabela 17).

Tabela 17. Korelacije genske ekspresije i koncentracija TGF- β 1 i RAGE sa demografskim karakteristikama pacijenata sa T1DM

Parametar	TGF- β 1 iRNK	TGF- β 1, ng/mL	RAGE iRNK	sRAGE, ng/mL
Uzrast, godine	-0,087	0,164 *	-0,112	0,041
ITM, kg/m ²	0,067	0,045	-0,089	-0,098
Obim struka, cm	-0,095	0,040	-0,073	0,475
Obim kukova, cm	0,001	0,138	-0,071	0,013
Sistolni pritisak, mm Hg	-0,053	0,127	-0,134	0,013
Dijastolni pritisak, mm Hg	0,030	-0,052	-0,004	-0,108

Prikazani su rezultati Spearman-ove korelacione analize: * $P < 0,05$.

U grupi sa T1DM koncentracije TGF- β 1 u plazmi su pozitivno korelirale sa uzrastom ispitanika, što ukazuje da su starija deca imala više koncentracije TGF- β 1 (Tabela 17).

U KG su koncentracije sRAGE bile u značajnoj negativnoj korelaciji sa ITM, obimom struka i kukova, kao i sa vrednostima sistolnog i dijastolnog pritiska (Tabela 18). Ostali demografski parametri pacijenata i kontrola nisu značajno korelirali sa genskom ekspresijom i koncentracijama ispitivanih inflamatornih markera.

Tabela 18. Korelacije genske ekspresije i koncentracija TGF- β 1 i RAGE sa demografskim karakteristikama ispitanika u KG

Parametar	TGF- β 1 iRNK	TGF- β 1, ng/mL	RAGE iRNK	sRAGE, ng/mL
Uzrast, godine	-0,060	0,073	-0,070	-0,175
ITM, kg/m ²	0,193	0,071	-0,061	-0,325 **
Obim struka, cm	0,135	-0,003	-0,006	-0,347 **
Obim kukova, cm	0,194	0,163	0,002	-0,377 **
Sistolni pritisak, mm Hg	0,200	0,095	-0,187	-0,319 **
Dijastolni pritisak, mm Hg	-0,178	-0,122	-0,179	-0,621 ***

Prikazani su rezultati Sperman-ove korelacione analize: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,01$.

Rezultati analize korelacija između nivoa iRNK i koncentracija TGF- β 1 i RAGE sa kliničkim i parametrima metaboličke kontrole pacijenata sa T1DM su prikazani u tabeli 19.

Tabela 19. Korelacije genske ekspresije i koncentracija TGF- β 1 i RAGE sa kliničkim karakteristikama i parametrima metaboličke kontrole pacijenata sa T1DM

Parametar	TGF- β 1, iRNK	TGF- β 1 ng/mL	RAGE iRNK	sRAGE, ng/mL
Trajanje dijabetesa, godine	0,069	0,243**	-0,086	0,210 **
Doza insulina, IU/kg/dan	0,058	0,139	-0,025	0,006
Glukoza, mmol/L	0,066	0,113	0,047	0,024
HbA _{1c} , %	-0,057	0,109	0,070	-0,058
Prosečna koncentracija glukoze (eAG), mmol/L	-0,082	0,106	0,036	-0,032
Urinarna ekskrecija albumina, μ g/min	-0,292 **	-0,052	-0,133	-0,098

Prikazani su rezultati Sberman-ove korelacione analize: ** $P < 0,01$.

Analiza korelacija kod pacijenata sa T1DM je pokazala da je genska ekspresija TGF- β 1 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi u negativnoj korelaciji sa urinarnom ekskrecijom albumina. Koncentracije TGF- β 1 i sRAGE u plazmi su bile u pozitivnoj korelaciji sa dužinom trajanja dijabetesa (Tabela 19). Rezultati prikazani u tabeli 20 pokazuju da su koncentracije TGF- β 1 kod ispitanika u KG pozitivno korelirale sa udelom HbA_{1c}, odnosno sa prosečnom koncentracijom glukoze. Nivoi genske ekspresije i koncentracije sRAGE u plazmi nisu značajno korelirale sa parametrima glikemije u KG.

Tabela 20. Korelacije genske ekspresije i koncentracija TGF- β 1 i RAGE sa parametrima glikemije u KG

Parametar	TGF- β 1, iRNK	TGF- β 1 ng/mL	RAGE iRNK	sRAGE, ng/mL
Glukoza, mmol/L	-0,086	-0,075	-0,132	0,111
HbA _{1c} , %	-0,074	0,267 *	-0,010	-0,089
Prosečna koncentracija glukoze (eAG), mmol/L	-0,023	0,299 **	0,022	-0,083

Prikazani su rezultati Sberman-ove korelacione analize: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Ispitivanjem korelacija analiziranih markera inflamacije sa parametrima lipidnog statusa utvrdili smo da su koncentracije sRAGE u plazmi pacijenata sa T1DM u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama ukupnog, LDL i non-HDL-H (Tabela 21). U KG nije bilo značajnih korelacija (Tabela 22).

Tabela 21. Korelacije genske ekspresije i koncentracija TGF- β 1 i RAGE sa parametrima lipidnog statusa u T1DM

Parametar	TGF- β 1 iRNK	TGF- β 1, ng/mL	RAGE iRNK	sRAGE, ng/mL
Ukupan holesterol, mmol/L	0,085	0,103	0,018	0,186 *
TG, mmol/L	0,010	0,099	-0,063	0,155
LDL-H, mmol/L	0,150	0,136	-0,003	0,211 **
HDL-H, mmol/L	-0,003	-0,035	0,057	-0,004
Non-HDL-H, mmol/L	0,122	0,158	0,012	0,216 **

Prikazani su rezultati Sberman-ove korelacione analize: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Tabela 22. Korelacije genske ekspresije i koncentracija TGF- β 1 i RAGE sa parametrima lipidnog statusa u KG

Parametar	TGF- β 1 iRNK	TGF- β 1, ng/mL	RAGE iRNK	sRAGE, ng/mL
Ukupan holesterol, mmol/L	0,118	0,062	0,008	-0,120
TG, mmol/L	-0,096	-0,061	-0,146	0,129
LDL-H, mmol/L	0,089	0,003	-0,075	-0,116
HDL-H, mmol/L	0,105	0,093	0,177	-0,053
Non-HDL-H, mmol/L	0,049	-0,009	-0,044	-0,034

Prikazani su rezultati Sberman-ove korelacione analize.

Zatim su ispitivane korelacije genske ekspresije i koncentracija inflamatornih markera u plazmi sa veličinom i raspodelom LDL subfrakcija kod pacijenata sa T1DM (Tabela 23). Ova analiza je pokazala da su nivoi iRNK TGF- β 1 u negativnoj korelaciji sa veličinom LDL čestica, a u pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelima LDL III subfrakcija. Koncentracija TGF- β 1 u plazmi bila je u pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelom LDL II subfrakcija, dok je negativno korelirala sa udelima LDL III i LDL IV subfrakcija, kao i sa ukupnim udelom malih, gustih LDL čestica. Nivoi genske ekspresije i koncentracije sRAGE nisu korelirali sa ispitivanim karakteristikama LDL čestica pacijenata sa T1DM.

Tabela 23. Korelacije genske ekspresije i koncentracija TGF- β 1 i RAGE sa veličinom i raspodelom LDL čestica kod pacijenata sa T1DM

Parametar	TGF- β 1 iRNK	TGF- β 1, ng/mL	RAGE iRNK	sRAGE, ng/mL
LDL dijametar, nm	-0,163 *	0,083	0,074	-0,064
LDL I, %	-0,072	0,121	0,045	-0,025
LDL II, %	0,047	0,217 **	0,102	0,127
LDL III, %	0,177 *	-0,221 **	-0,074	-0,010
LDL IV, %	-0,048	-0,192 **	-0,145	-0,043
Male, guste LDL, %	0,047	-0,251 **	-0,131	-0,072

Prikazani su rezultati Sperman-ove korelacione analize: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

U KG, nivoi iRNK TGF- β 1 i koncentracije TGF- β 1 su pozitivno korelirali sa veličinom LDL čestica i relativnim udelima LDL I subfrakcija, a negativno sa udelom malih, gustih LDL čestica. Dodatno, koncentracija TGF- β 1 je bila i u negativnoj korelaciji sa relativnim udelom LDL IV subfrakcija. Viši nivoi genske ekspresije RAGE su korelirali sa većim dijametrima LDL čestica i manjom zastupljenošću malih, gustih LDL čestica (Tabela 24).

Tabela 24. Korelacije genske ekspresije i koncentracija TGF- β 1 i RAGE sa veličinom i raspodelom LDL čestica u KG

Parametar	TGF- β 1 iRNK	TGF- β 1, ng/mL	RAGE iRNK	sRAGE, ng/mL
LDL dijametar, nm	0,278 *	0,248 *	0,186	0,010
LDL I, %	0,376 **	0,355 **	0,279 *	-0,053
LDL II, %	0,011	0,194	0,078	0,046
LDL III, %	-0,210	-0,101	-0,132	0,008
LDL IV, %	-0,103	-0,326 **	-0,169	-0,106
Male, guste LDL, %	-0,271 *	-0,385 **	-0,251 *	-0,011

Prikazani su rezultati Sberman-ove korelacione analize: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Korelacije genske ekspresije i koncentracija TGF- β 1 i RAGE sa veličinom i raspodelom HDL čestica kod pacijenata sa T1DM i kontrola prikazane su u tabelama 25 i 26.

Tabela 25. Korelacije genske ekspresije i koncentracija TGF- β 1 i RAGE sa veličinom i raspodelom HDL čestica kod pacijenata sa T1DM

Parametar	TGF- β 1 iRNK	TGF- β 1, ng/mL	RAGE iRNK	sRAGE, ng/mL
HDL dijametar, nm	0,085	0,072	-0,019	-0,011
HDL 2b, %	0,119	-0,030	-0,101	-0,024
HDL 2a, %	0,063	-0,307 **	-0,004	-0,085
HDL 3a, %	-0,054	-0,117	0,107	0,009
HDL 3b, %	-0,226 **	0,198 *	-0,070	0,018
HDL 3c, %	0,016	0,056	0,134	0,036

Prikazani su rezultati Sperman-ove korelacione analize: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Tabela 26. Korelacije genske ekspresije i koncentracija TGF- β 1 i RAGE sa veličinom i raspodelom HDL čestica u KG

Parametar	TGF- β 1 iRNK	TGF- β 1, ng/mL	RAGE iRNK	sRAGE, ng/mL
HDL dijametar, nm	0,148	-0,018	0,089	-0,039
HDL 2b, %	0,274 *	0,525 **	0,264 *	-0,032
HDL 2a, %	-0,128	-0,338	-0,004	-0,059
HDL 3a, %	-0,184	-0,426 **	-0,199	0,128
HDL 3b, %	-0,288 *	-0,455 **	-0,309 **	0,078
HDL 3c, %	-0,049	-0,265 *	-0,202	-0,028

Prikazani su rezultati Sperman-ove korelacione analize: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Kod pacijenata sa T1DM genska ekspresija TGF- β 1 je bila u inverznoj korelaciji sa relativnim udelima HDL 3b subfrakcija. Nasuprot, koncentracija TGF- β 1 u plazmi je pozitivno korelirala sa udelom HDL 3b čestica, dok je sa relativnim udelom HDL 2a subfrakcija bila u negativnoj korelaciji. Kod ispitanika u KG je utvrđena pozitivna korelacija genske ekspresije i koncentracije TGF- β 1 sa relativnim udelom HDL 2b, kao i negativna korelacija oba parametra sa udelom HDL 3b subfrakcija. Pored toga, koncentracija TGF- β 1 u plazmi negativno je korelirala i sa relativnim udelima HDL 3a i HDL 3c subfrakcija, odnosno bila je u inverznoj korelaciji sa ukupnim udelom malih HDL 3 čestica. Konačno, viša genska ekspresija RAGE u mononuklearnim ćelijama periferne krvi ispitanika u KG bila je korelaciji sa višim udelom HDL 2b, a nižim udelom HDL 3b subfrakcija.

Tabela 27. Korelacije genske ekspresije i koncentracija TGF- β 1 i RAGE sa PCSK9 kod pacijenata sa T1DM i u KG

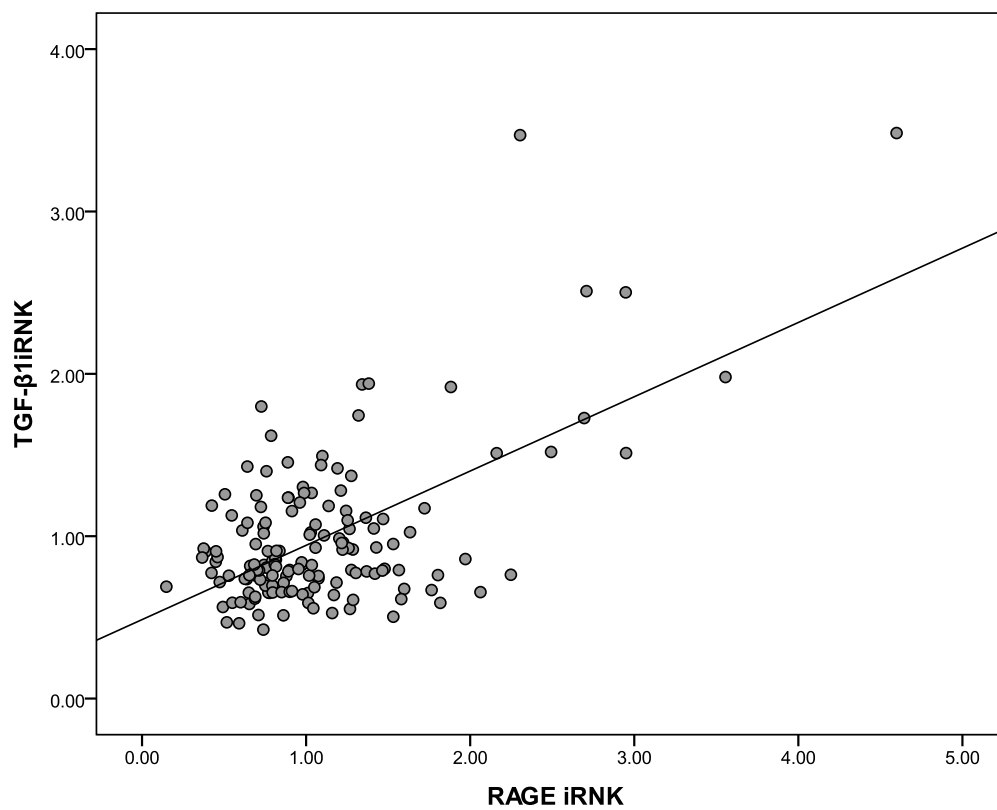
Grupa	Parametar		TGF- β 1 iRNK	TGF- β 1, ng/mL	RAGE iRNK	sRAGE, ng/mL
T1DM	PCSK9	r	-0,117	-0,104	-0,014	-0,046
		P	0,146	0,205	0,865	0,570
KG	PCSK9	r	0,029	-0,184	-0,132	0,094
		P	0,806	0,107	0,265	0,426

Prikazani su rezultati Sperman-ove korelacione analize.

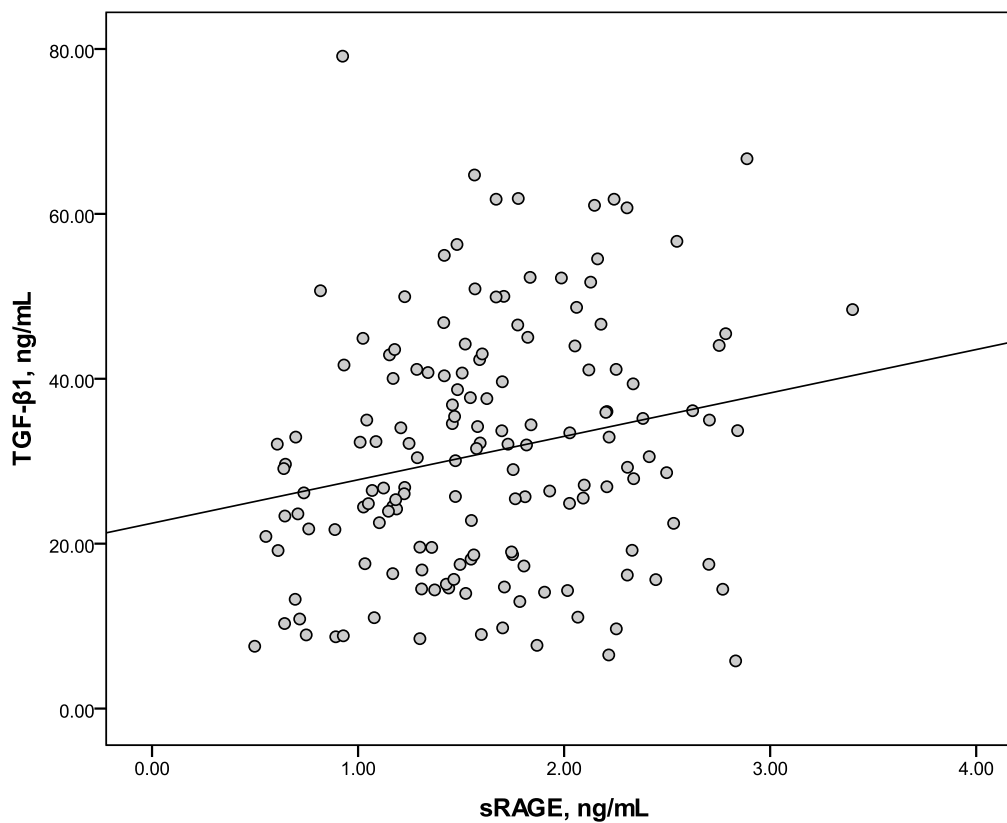
Kao što se može videti u tabeli 27, nije bilo značajne korelacije između genske ekspresije i koncentracija TGF- β 1 i RAGE u plazmi sa koncentracijama PCSK9 ni kod pacijenata sa T1DM, niti u KG. Međutim, u grupi pacijenata sa T1DM utvrdili smo da postoji značajna pozitivna korelacija između koncentracija PCSK9 i hsCRP-a ($r = 0,174$, $P < 0,05$), dok u KG nije bilo značajne korelacije ($r = -0,056$, $P = 0,629$).

Na kraju smo analizirali da li postoji međusobna povezanost ispitivanih markera inflamacije kod pacijenata sa T1DM i u KG. Rezultati su pokazali da su genske ekspresije TGF- β 1 i RAGE u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa T1DM u visokoj pozitivnoj korelaciji ($r = 0,273$, $P < 0,001$). Takođe, kod pacijenata sa T1DM postojala je i značajna pozitivna korelacija između plazma koncentracija TGF- β 1 i sRAGE ($r = 0,221$, $P < 0,001$). Nasuprot tome, genska ekspresija i koncentracija TGF- β 1 nisu bile u korelaciji ($r = 0,123$, $P = 0,130$), kao ni genska ekspresija RAGE i koncentracija sRAGE u plazmi ($r = -0,109$, $P = 0,183$).

Na slikama 15 i 16 dat je grafički prikaz značajnih korelacija u grupi pacijenata sa T1DM, a u tabeli 28 su prikazani rezultati korelacione analize u KG.



Slika 15. Korelacija između genske ekspresije TGF-β1 i RAGE kod pacijenata sa T1DM



Slika 16. Korelacija između koncentracija TGF-β1 i sRAGE kod pacijenata sa T1DM

Tabela 28. Korelacije genske ekspresije i koncentracija markera inflamacije u KG

Parametar		TGF- β 1 iRNK	TGF- β 1, ng/mL	RAGE iRNK	sRAGE, ng/mL	CRP, mg/L
TGF- β 1 iRNK	R	-	0,412	0,666	-0,136	0,197
	P		<0,001	<0,001	0,268	0,099
TGF- β 1, ng/mL	R	0,412	-	0,400	-0,033	0,164
	P	<0,001		<0,001	0,782	0,157
RAGE iRNK	R	0,666	0,400	-	-0,023	-0,064
	P	<0,001	<0,001		0,853	0,597
sRAGE, ng/mL	R	-0,136	-0,033	-0,023	-	-0,299
	P	0,268	0,782	0,853		<0,05
CRP, mg/L	R	0,197	0,164	-0,064	-0,299	-
	P	0,099	0,157	0,597	<0,05	

Prikazani su rezultati Spermán-ove korelacione analize.

U KG je utvrđena značajna pozitivna korelacija između genske ekspresije i koncentracije TGF- β 1 u plazmi. Genska ekspresija TGF- β 1 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pozitivno je korelirala sa ekspresijom gena za RAGE. Pored toga, ustanovili smo da u KG postoji pozitivna korelacija između nivoa iRNK RAGE i koncentracije TGF- β 1 u plazmi. Koncentracije sRAGE i hsCRP u plazmi su bile u negativnoj korelaciji (Tabela 28).

4.4. Biohemijski parametri funkcije bubrega, jetre i tireoidne žlezde

Parametri bubrežne funkcije i enzimski profil jetre kod pacijenata sa T1DM i KG se nisu značajno razlikovali. Takođe, nije bilo značajne razlike u koncentracijama TSH i fT4. Utvrdili smo da pacijenti imaju značajno niže koncentracije mokraćne kiseline od ispitanika u KG. Rezultati su sumirani u tabeli 29.

Tabela 29. Biohemijski parametri funkcije bubrega, jetre i tireoidne žlezde

Parametar	T1DM	KG	P
Urea, mmol/L	4,20 ± 0,89	4,17 ± 0,65	0,727
Kreatinin, µmol/L #	0,72 (0,57-0,90)	0,75 (0,58-1,00)	0,354
JGF, mL/min/1,73 m ²	80,3 ± 10,0	79,8 ± 11,3	0,742
Mokraćna kiselina, µmol/L	220,89 ± 53,52	245,61 ± 56,71	<0,01
AST	18 (16-22)	18 (15-21)	0,226
ALT #	14 (11-16)	13 (11-17)	0,679
γGT #	12 (9-15)	11 (9-13)	0,466
TSH, mU/L #	2,92 (1,97-3,82)	2,45 (1,93-4,11)	0,853
fT4, pmol/L #	15,17 (13,96-17,29)	14,80 (14,01-16,93)	0,675

Kontinuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni Student-ovim t testom. Kategorički podaci su prikazani kao relativne frekvence i poređeni Chi-kvadrat testom.

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi).

4.5. Uticaj metaboličke kontrole na lipidne i inflamatorne markere ateroskleroze

4.5.1. Demografske karakteristike i biohemijski parametri pacijenata sa T1DM u odnosu na postignutu metaboličku kontrolu

U tabeli 30 su prikazane demografske karakteristike pacijenata sa T1DM u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole, a kliničke karakteristike i parametri glukoregulacije u tabeli 31.

Tabela 30. Demografske karakteristike pacijenata sa T1DM u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole

Parametar	Metabolička kontrola			P
	Dobra	Suboptimalna	Loša	
Pol, (%)				0,943
Dečaci	51,7	51,8	48,6	
Devojčice	48,3	48,2	51,4	
Uzrast, godine	14,1 ± 3,4	13,9 ± 2,7	13,8 ± 3,0	0,818
Pubertetski status, %				0,469
Prepubertet	20,7	21,7	18,9	
Pubertet	23,0	33,7	35,1	
Postpubertet	56,3	44,6	45,9	
ITM, kg/m ²	20,1 ± 3,3	20,2 ± 3,2	20,8 ± 3,7	0,564
ITM z-skor #	0,25 (-0,38 – 0,68)	0,30 (-0,40 – 0,80)	0,40 (-0,58 – 1,08)	0,517
Status uhranjenosti, %				0,100
Normalna uhranjenost	88,4	86,7	70,3	
Prekomerna uhranjenost	8,1	10,8	21,6	
Gojaznost	3,5	2,4	8,1	
Obim struka, cm	73,8 ± 9,0	73,8 ± 8,6	75,4 ± 8,4	0,642
Obim kukova, cm	91,4 ± 12,3	91,5 ± 10,8	93,3 ± 9,9	0,746

Kontinuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni ANOVA testom. Kategorički podaci su prikazani kao relativne frekvence i poređeni Chi-kvadrat testom.

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Kruskal-Wallis testom.

Analizom rezultata prikazanih u tabeli 30 utvrđeno je da se grupe pacijenata sa dobrom, suboptimalnom i lošom metaboličkom kontrolom ne razlikuju u odnosu na uzrast i pol pacijenata. Takođe, pacijenti različitog pubertetskog i statusa uhranjenosti bili su ravnomerno zastupljeni u posmatranim grupama. U skladu sa prethodnim, nismo utvrdili razlike u antropometrijskim karakteristikama između grupa sa dobrom, suboptimalnom i lošom metaboličkom kontrolom.

Tabela 31. Kliničke karakteristike i parametri glukoregulacije u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole

Parametar	Metabolička kontrola			P
	Dobra	Suboptimalna	Loša	
Uzrast pri postavljanju dijagnoze, godine #	8,0 (5,0-11,0)	6,0 (4,0-11,0)	6,5 (4,0-9,0)	0,288
Trajanje dijabetesa, godine #	6,0 (4,0-8,0)	7,0 (5,0-8,0)	7,0 (4,0-9,0)	0,345
Doza insulina, IU/kg/dan #	0,97 (0,71-1,14)	1,05 (0,89-1,24) ^{aa}	1,07 (0,89-1,31) ^a	<0,01
Glukoza, mmol/L	10,32 ± 4,24	11,86 ± 4,41	12,79 ± 5,54 ^a	<0,05
HbA _{1c} , % #	6,8 ± 0,5	8,1 ± 0,4 ^{aa}	10,4 ± 1,9 ^{aa, bb}	<0,001
eAG, mmol/L	8,21 ± 0,90	11,00 ± 5,96 ^{aa}	14,07 ± 3,32 ^{aa, bb}	<0,001
Urinarna ekskrecija albumina, µg/min #	4,3 (2,9-6,8)	4,4 (2,6-7,5)	5,2 (3,2-8,0)	0,848
Urinarna ekskrecija albumina ≥ 7,5 µg/min, %	22,5	25,0	32,1	0,611

Kontinuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni ANOVA testom i Tukey *post hoc* testom.

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Kruskal-Wallis testom i Mann-Whitney U *post hoc* testom.

^a Značajna razlika u odnosu na pacijente sa dobrom metaboličkom kontrolom (^aP<0,05; ^{aa}P<0,01);

^b Značajna razlika u odnosu na pacijente sa suboptimalnom metaboličkom kontrolom (^bP<0,05; ^{bb}P<0,01).

Nismo utvrdili značajne razlike između posmatranih grupa u uzrastu pri kom je postavljena dijagnoza dijabetesa, kao ni u dužini trajanja bolesti. Dnevne doze insulina koje su primali pacijenti sa suboptimalnom i lošom metaboličkom kontrolom su bile značajno više od doza koje su primali pacijenti sa dobrom metaboličkom kontrolom. Očekivano, koncentracija glukoze, udeo HbA_{1c} i prosečna koncentracija glukoze su značajno rasli sa pogoršanjem metaboličke kontrole (Tabela 31)..

Koncentracije lipidnih parametara u serumu u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole date su u tabeli 32. Utvrdili smo da pacijenti sa suboptimalnom i lošom metaboličkom kontrolom imaju značajno više koncentracije TG, ukupnog i LDL-H od pacijenata sa dobrom metaboličkom kontrolom. Pored toga, koncentracije TG, ukupnog i LDL-H u grupi sa lošom metaboličkom kontrolom bile su značajno više nego u grupi sa suboptimalnom metaboličkom kontrolom. Razlike su ostale statistički značajne i nakon korekcije za dnevnu dozu insulina ($P<0,01$ za sva poređenja) i status uhranjenosti ($P<0,01$ za sva poređenja). Koncentracije HDL-H se nisu značajno razlikovale između posmatranih grupa.

Tabela 32. Parametri lipidnog profila pacijenata sa T1DM u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole

Parametar	Metabolička kontrola			P
	Dobra	Suboptimalna	Loša	
Ukupan holesterol, mmol/L	3,89 ± 0,60	4,25 ± 0,88 ^a	4,94 ± 1,15 ^{aa, bb}	<0,001
TG, mmol/L [#]	0,61 (0,52–0,78)	0,79 (0,65–0,93) ^{aa}	0,93 (0,66–1,32) ^{aa, b}	<0,001
LDL-H, mmol/L	1,94 ± 0,55	2,20 ± 0,75 ^a	2,77 ± 1,02 ^{aa, bb}	<0,001
HDL-H, mmol/L	1,65 ± 0,36	1,66 ± 0,36	1,59 ± 0,49	0,639

Kontinuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni ANOVA testom i Tukey *post hoc* testom.

[#] Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Kruskal-Wallis testom i Mann-Whitney U *post hoc* testom.

^a Značajna razlika u odnosu na pacijente sa dobrom metaboličkom kontrolom (^a $P<0,05$; ^{aa} $P<0,01$);

^b Značajna razlika u odnosu na pacijente sa suboptimalnom metaboličkom kontrolom (^b $P<0,05$; ^{bb} $P<0,01$).

4.5.2. Profil LDL i HDL subfrakcija pacijenata sa T1DM u odnosu na postignutu metaboličku kontrolu

Analiza veličine i raspodele LDL subfrakcija je pokazala da sa pogoršanjem metaboličke kontrole T1DM dolazi do preraspodele LDL čestica ka manjim dijametrima. Iako nije utvrđena statistički značajna razlika, uočen je trend smanjenja prosečne veličine LDL čestica, odnosno porasta relativnog uдела malih, gustih LDL čestica ($P=0,063$) sa pogoršanjem metaboličke kontrole. U grupi sa lošom metaboličkom kontrolom udeo LDL I subfrakcija bio je značajno niži od uдела u grupi sa suboptimalnom metaboličkom kontrolom (Tabela 33).

Tabela 33. Veličina i raspodela LDL subfrakcija kod pacijenata sa T1DM u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole

Parametar	Metabolička kontrola			P
	Dobra	Suboptimalna	Loša	
LDL dijametar, nm	26,29 ± 1,17	26,43 ± 1,30	25,95 ± 1,25	0,147
LDL dijametar < 25,5 nm, %	25,0	27,7	37,8	0,347
LDL subfrakcije, %				
LDL I	22,4 ± 5,8	24,9 ± 8,2	20,5 ± 7,4 ^b	<0,05
LDL II	27,2 ± 5,2	27,6 ± 5,2	28,5 ± 7,6	0,527
LDL III	21,3 ± 3,7	20,6 ± 4,5	22,2 ± 6,2	0,227
LDL IV	29,2 ± 5,8	26,8 ± 6,4	28,8 ± 12,2	0,122
Male, guste LDL čestice, %	50,4 ± 8,0	47,5 ± 9,3	51,0 ± 11,8	0,063

Kontinuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni ANOVA testom i Tukey *post hoc* testom. Kategorički podaci su prikazani kao relativne frekvence i poređeni Chi-kvadrat testom. # Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Kruskal-Wallis testom i Mann-Whitney U *post hoc* testom.

^b Značajna razlika u odnosu na pacijente sa suboptimalnom metaboličkom kontrolom (^b: $P<0,05$).

U grupi sa lošom metaboličkom kontrolom bila je najmanja prosečna veličina HDL čestica. Ovi pacijenti su imali značajno niži relativni udeo HDL 2b, a viši udeo HDL 3c čestica u odnosu na pacijente sa dobrom i suboptimalnom metaboličkom kontrolom (Tabela 34). Prethodno opisane razlike u relativnim udelima LDL i HDL subfrakcija ostale su značajne i nakon korekcije za status uhranjenosti (LDL I: $P<0,01$; HDL 2b: $P<0,05$ i HDL 3c: $P<0,01$) i dnevnu dozu insulina (LDL I: $P<0,05$; HDL 2b: $P<0,05$ i HDL 3c: $P<0,05$).

Tabela 34. Veličina i raspodela HDL subfrakcija kod pacijenata sa T1DM u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole

Parametar	Metabolička kontrola			P
	Dobra	Suboptimalna	Loša	
HDL dijametar, nm	10,17 ± 0,79	10,06 ± 0,92	9,35 ± 1,00 ^{aa, bb}	<0,001
HDL dijametar < 8,8 nm, %	11,9	20,5	45,9	<0,001
HDL subfrakcije:				
HDL 2b, %	42,9 ± 8,8	41,9 ± 7,5	38,0 ± 7,4 ^{aa, b}	<0,01
HDL 2a, %	21,5 ± 4,4	20,4 ± 3,0	21,1 ± 3,8	0,164
HDL 3a, %	16,8 ± 3,6	17,6 ± 5,0	18,2 ± 5,4	0,239
HDL 3b, %	10,4 ± 4,5	11,1 ± 5,2	11,4 ± 3,9	0,430
HDL 3c, %	8,4 ± 4,4	8,9 ± 3,9	11,2 ± 4,3 ^{aa, b}	<0,01

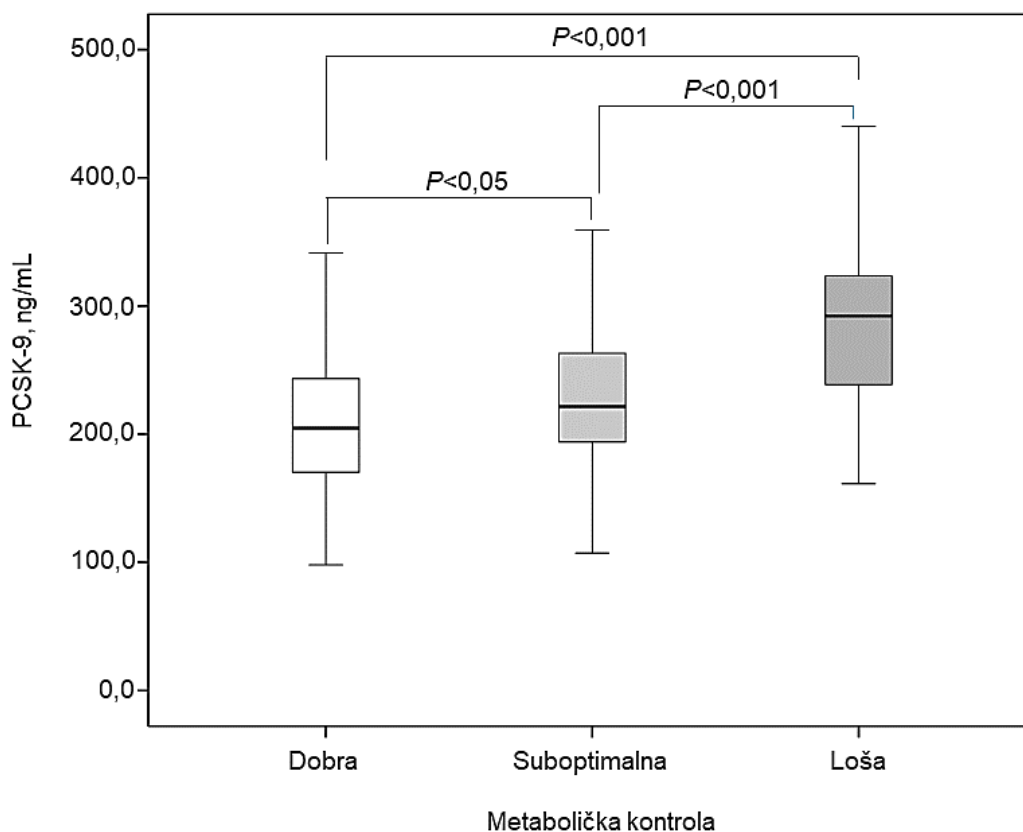
Kontinuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni ANOVA testom i Tukey *post hoc* testom. Kategorički podaci su prikazani kao relativne frekvence i poređeni Chi-kvadrat testom. # Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Kruskal-Wallis testom i Mann-Whitney U *post hoc* testom.

^a Značajna razlika u odnosu na pacijente sa dobrom metaboličkom kontrolom (^aP<0,05; ^{aa}P<0,01);

^b Značajna razlika u odnosu na pacijente sa suboptimalnom metaboličkom kontrolom (^bP<0,05; ^{bb}P<0,01).

4.5.3. Koncentracije PCSK9 kod pacijenata sa T1DM u odnosu na postignutu metaboličku kontrolu

Na slici 17 su prikazane koncentracije PCSK9 kod pacijenata sa T1DM koji imaju dobru, suboptimalnu i lošu metaboličku kontrolu. Utvrdili smo da sa pogoršanjem metaboličke kontrole značajno raste koncentracija PCSK9. Konkretno, koncentracije PCSK9 u grupi sa dobrom metaboličkom kontrolom (medijana: 206,13 ng/mL; interkvartilni raspon: 170,35–244,75 ng/mL) bila je značajno niža nego u grupi sa suboptimalnom (medijana: 221,78 ng/mL; interkvartilni raspon: 193,00–264,57 ng/mL) i lošom metaboličkom kontrolom (medijana: 293,00 ng/mL; interkvartilni raspon: 237,74–338,43 ng/mL). Razlika između grupa sa suboptimalnom i lošom metaboličkom kontrolom je takođe bila značajna (P<0,001). Nakon korekcije za dnevnu dozu insulina (P<0,001 za sva poređenja) i status uhranjenosti razlike između grupa su ostale statistički značajne (P<0,001 za sva poređenja).



Slika 17. Koncentracije PCSK9 kod pacijenata sa T1DM u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole

Inicijalna analiza je ponovljena nakon što su pacijenti sa T1DM razvrstani po polu. Koncentracije PCSK9 kod dečaka (medijana: 210,81 ng/mL; interkvartilni raspon: 182,81-259,00 ng/mL) i devojčica sa T1DM (medijana: 235,56 ng/mL; interkvartilni raspon: 188,61-277,22 ng/mL) se nisu značajno razlikovale ($P=0,226$). U grupi dečaka i devojčica dodatno su analizirane koncentracije PCSK9 i komponente metaboličkog sindroma u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole (Tabela 35). Ova analiza je pokazala da sa pogoršanjem metaboličke kontrole značajno raste koncentracija TG kako kod dečaka, tako i kod devojčica sa T1DM. Koncentracije glukoze kod dečaka sa lošom metaboličkom kontrolom bile su značajno više od koncentracija u grupi devojčica sa istim stepenom metaboličke kontrole.

Ostale komponente metaboličkog sindroma i koncentracije PCSK9 se nisu značajno razlikovale između dečaka i devojčica sa istim stepenom postignute metaboličke kontrole.

Tabela 35. Koncentracije PCSK9 i komponente metaboličkog sindroma kod pacijenata sa T1DM u odnosu na pol i postignutu metaboličku kontrolu

		Metabolička kontrola			
	Parametar	Dobra	Suboptimalna	Loša	<i>P</i>
Dečaci	PCSK9, ng/mL #	206,01 (169,28-242,46)	211,84 (192,14-254,15)	265,02 (210,65-323,13) ^{aa, b}	<0,01
	ITM, kg/m ²	20,6 ± 3,4	20,1 ± 2,8	20,3 ± 3,2	0,732
	Obim struka, cm	76,7 ± 9,3	74,8 ± 8,4	76,8 ± 10,8	0,598
	Glukoza, mmol/L	10,63 ± 4,63	12,69 ± 4,78	13,17 ± 5,13 ^a	0,067
	TG, mmol/L #	0,65 (0,53-0,82)	0,76 (0,65-0,92) ^a	0,79 (0,58-1,30) ^a	<0,05
	HDL-H, mmol/L	1,61 ± 0,36	1,65 ± 0,40	1,62 ± 0,46	0,863
Devojčice	PCSK9, ng/mL #	211,15 (177,18-250,24)	237,33 (199,79-265,98)	296,79 (269,18-343,28) ^{aa, b}	<0,01
	ITM, kg/m ²	19,6 ± 3,1	20,4 ± 3,6	21,2 ± 4,2	0,214
	Obim struka, cm	70,8 ± 7,8	72,6 ± 8,7	73,8 ± 3,9	0,393
	Glukoza, mmol/L	9,98 ± 3,81	10,98 ± 3,84	12,42 ± 6,05	0,135
	TG, mmol/L #	0,61 (0,50-0,77)	0,79 (0,67-0,93) ^{aa}	1,06 (0,69-1,34) ^{aa, b}	<0,001
	HDL-H, mmol/L	1,71 ± 0,37	1,67 ± 0,32	1,56 ± 0,52	0,393

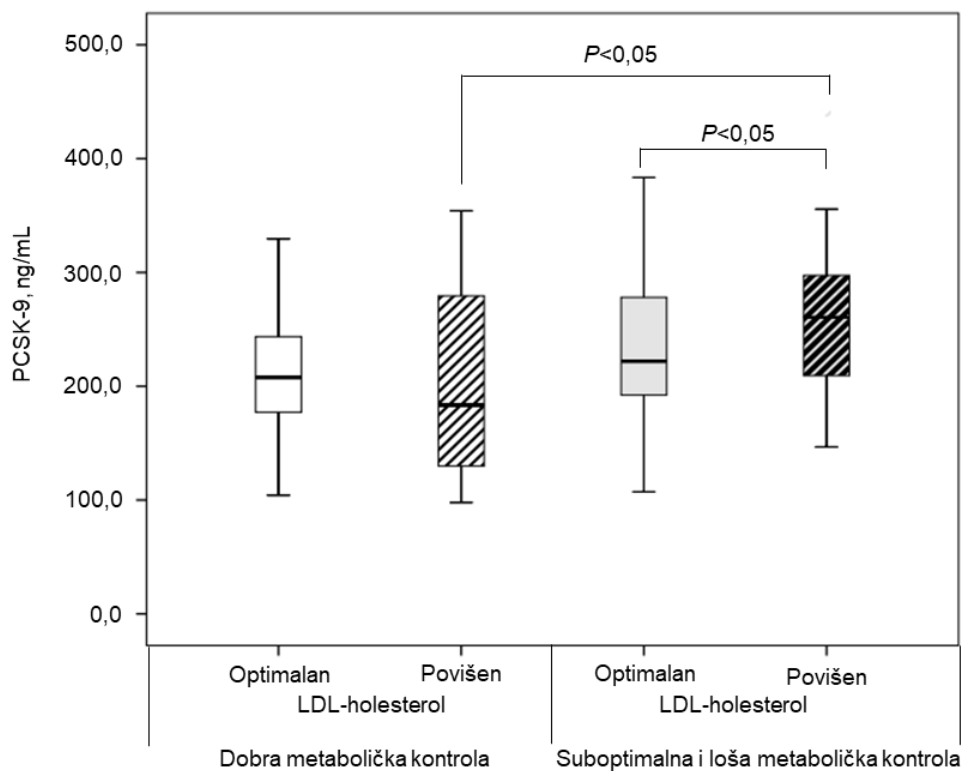
Kontinuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni ANOVA testom i Tukey *post hoc* testom.

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Kruskal-Wallis testom i Mann-Whitney U *post hoc* testom.

^a Značajna razlika u odnosu na pacijente sa dobrom metaboličkom kontrolom (^a*P*<0,05; ^{aa}*P*<0,01);

^b Značajna razlika u odnosu na pacijente sa suboptimalnom metaboličkom kontrolom (^b*P*<0,05; ^{bb}*P*<0,01).

Zatim smo analizirali koncentracije PCSK9 uzimajući u obzir postignutu metaboličku kontrolu i koncentraciju LDL-H (Slika 18). Većina pacijenata sa dobrom metaboličkom kontrolom je imala i optimalne koncentracije LDL-H (90,8%). U grupi sa dobrom metaboličkom kontrolom nije bilo značajne razlike ($P=0,447$) u koncentracijama PCSK9 između pacijenata sa optimalnim (medijana: 207,83 ng/mL; interkvartilni raspon: 173,78-245,87 ng/mL; $N=79$) i povišenim koncentracijama LDL-H (medijana: 183,51 ng/mL; interkvartilni raspon: 116,46-310,34 ng/mL; $N=8$). Sa druge strane, u grupi sa suboptimalnom i lošom metaboličkom kontrolom trećina pacijenata je imala povišene koncentracije LDL-H (34,1%). Ti pacijenti su imali značajno više ($P<0,05$) koncentracije PCSK9 (medijana: 260,67 ng/mL; interkvartilni raspon: 209,08-297,59 ng/mL; $N=41$) od pacijenata sa optimalnim koncentracijama LDL-H (medijana: 222,01 ng/mL; interkvartilni raspon: 190,44-278,36 ng/mL; $N=120$). Sem toga, koncentracije PCSK9 u grupi sa suboptimalnom i lošom metaboličkom kontrolom i povišenim koncentracijama LDL-H bile su značajno više od koncentracija koje su imali pacijenti sa dobrom metaboličkom kontrolom, a povišenim koncentracijama LDL-H ($P<0,05$).



Slika 18. Koncentracije PCSK9 kod pacijenata sa T1DM u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole i koncentracije LDL-H

4.5.4. Korelacije PCSK9 sa LDL i HDL subfrakcijama

U tabeli 36 su prikazani rezultati univarijantne i multivarijantne linearne regresione analize korelacija između koncentracija PCSK9 i veličine i udela LDL i HDL subfrakcija kod pacijenata sa T1DM u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole.

Kod pacijenata sa dobrom metaboličkom kontrolom utvrdili smo da su koncentracije PCSK9 u pozitivnoj korelaciji sa dijametrima LDL čestica, a u negativnoj korelaciji sa relativnim udelima malih, gustih LDL čestica. U ovoj grupi pacijenata korelacije između koncentracija PCSK9 i veličine HDL čestica, udela HbA_{1c} i koncentracija TG nisu dostigle statističku značajnost.

U grupi sa suboptimalnom i lošom metaboličkom kontrolom koncentracije PCSK9 su pozitivno korelirale sa dnevnom dozom insulina, udelom HbA_{1c} i koncentracijama TG, ukupnog i LDL-H. Ova analiza je pokazala i da su koncentracije PCSK9 u negativnoj korelaciji sa dijametrima HDL čestica, a u pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelima HDL 3c subfrakcija.

Sa ciljem da se dodatno istraži veza između koncentracija PCSK9 i karakteristika lipoproteinskih subfrakcija formirali smo dva modela primenom multivarijantne linearne regresione analize. U grupi sa dobrom metaboličkom kontrolom model 1 su činile sledeće varijable: LDL dijametar, pol, status uhranjenosti, HDL dijametar, udeo HbA_{1c} i koncentracija TG. Prilikom formiranja modela 2 varijabla LDL dijametar je zamenjena promenljivom koja predstavlja relativni udeo malih, gustih LDL čestica, dok su ostale varijable bile iste kao u modelu 1. Nakon multivarijantne analize veći dijametri LDL čestica (model 1) i niži udeli malih, gustih LDL čestica (model 2) ostali su značajno udruženi sa višim koncentracijama PCSK9.

U multivarijantnoj analizi kod pacijenata sa T1DM koji imaju suboptimalnu i lošu metaboličku kontrolu u model 1 su uključene sledeće varijable: HDL dijametar, pol, status uhranjenosti, dnevna doza insulina, udeo HbA_{1c} i koncentracije TG, ukupnog i LDL-H. U model 2 uključena je promenljiva koja predstavlja relativni udeo HDL 3c subfrakcija umesto varijable HDL dijametar, a ostale varijable su bile iste kao u modelu 1. Rezultati multivarijantne analize su pokazali da su koncentracije PCSK9 nezavisno povezane sa relativnim udelima HDL 3c subfrakcija (model 2), dok veza sa veličinom HDL čestica nije više bila statistički značajna (model 1).

Tabela 36. Rezultati univarijantne i multivarijantne linearne regresione analize asocijacija između koncentracije PCSK9 i subfrakcija lipoproteina kod pacijenata sa T1DM u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole

Dobra metabolička kontrola				Suboptimalna i loša metabolička kontrola		
	Parametar	β	<i>P</i>	Parametar	β	<i>P</i>
Unadjusted	LDL dijametar, nm	0,215	<0,05	HDL dijametar, nm	-0,184	<0,01
	Male, guste LDL, %	-0,312	<0,01	HDL 3c, %	0,318	<0,001
	HDL dijametar, nm	-0,207	0,058	Doza insulina, IU/kg/dan	0,200	<0,05
	HbA _{1c} , %	0,202	0,062	HbA _{1c} , %	0,332	<0,001
	TG, mmol/L	0,197	0,069	Ukupan holesterol, mmol/L	0,321	<0,001
			TG, mmol/L	0,345	<0,001	
			LDL-H, mmol/L	0,283	<0,01	
Model 1 ^a	LDL dijametar, nm	0,303	<0,01	HDL dijametar, nm	-0,002	0,983
	HbA _{1c} , %	0,199	0,068	Doza insulina, IU/kg/dan	0,193	<0,05
	TG, mmol/L	0,112	0,318	HbA _{1c} , %	0,132	0,187
	HDL dijametar, nm	-0,301	<0,01	Ukupan holesterol, mmol/L	0,250	0,243
			TG, mmol/L	0,290	<0,001	
			LDL-H, mmol/L	-0,097	0,646	
Model 2 ^a	Male, guste LDL, %	-0,304	<0,01	HDL 3c, %	0,245	<0,01
	HbA _{1c} , %	0,171	0,116	Doza insulina, IU/kg/dan	0,157	0,074
	TG, mmol/L	0,061	0,588	HbA _{1c} , %	0,133	0,164
	HDL dijametar, nm	-0,233	<0,01	Ukupan holesterol, mmol/L	0,338	0,080
			TG, mmol/L	0,219	<0,001	
			LDL-H, mmol/L	-0,194	0,311	

Kategoričke promenljive uključene u modele 1 i 2: pol (0-ženski; 1-muški) i status uhranjenosti (0- normalna uhranjenost; 1- prekomerna uhranjenost i gojaznost)

Zatim smo analizirali koncentracije PCSK9 i raspodele LDL i HDL subfrakcija kod pacijenata sa T1DM koji imaju optimalne i povišene koncentracije LDL-H (Tabela 37). Utvrdili smo da su koncentracije PCSK9 kod pacijenata sa rizičnim koncentracijama LDL-H značajno više od koncentracija kod pacijenata sa optimalnim koncentracijama LDL-H. Pacijenti sa povišenim koncentracijama LDL-H su imali značajno manje LDL dijemetre, usled značajnog smanjenja relativnog udela LDL I subfrakcija, a porasta udela malih, gustih LDL čestica. Ovi pacijenti su imali i značajno manje dijemetre HDL čestica i niži udeo HDL 2b subfrakcija od pacijenata sa optimalnim koncentracijama LDL-H.

Tabela 37. Koncentracije PCSK9 i raspodela LDL i HDL subfrakcija kod pacijenata sa T1DM u zavisnosti od koncentracije LDL-H

Parametar	LDL-H		P
	Optimalan ($< 2,6$ mmol/L)	Povišen ($\geq 2,6$ mmol/L)	
PCSK9, ng/mL [#]	213,34 (183,12-259,71)	249,29 (192,70-297,58)	<0,01
LDL dijametar, nm	26,43 \pm 1,22	25,83 \pm 1,24	<0,01
LDL subfrakcije, %			
LDL I	23,8 \pm 7,1	20,8 \pm 7,5	<0,05
LDL II	27,7 \pm 5,5	26,9 \pm 5,7	0,392
LDL III	20,9 \pm 4,2	21,9 \pm 5,5	0,243
LDL IV	27,6 \pm 6,7	30,4 \pm 9,4	0,122
Male, guste LDL čestice, %	48,6 \pm 8,8	52,3 \pm 10,1	<0,05
HDL dijametar, nm	10,01 \pm 0,89	9,71 \pm 0,97	<0,05
HDL subfrakcije:			
HDL 2b, %	42,3 \pm 8,3	39,9 \pm 7,7	<0,05
HDL 2a, %	21,5 \pm 4,4	21,1 \pm 3,8	0,080
HDL 3a, %	17,3 \pm 4,3	17,3 \pm 4,9	0,946
HDL 3b, %	10,5 \pm 4,3	11,9 \pm 5,7	0,066
HDL 3c, %	8,8 \pm 4,4	10,2 \pm 4,1	0,068

Podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije i poređeni Student-ovim t testom.

[#] Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Mann-Whitney U testom.

Tabela 38 prikazuje rezultate korelacione analize između PCSK9 i lipoproteinskih subfrakcija u grupama pacijenata sa optimalnim i povišenim koncentracijama LDL-H. Može se videti da je kod pacijenata sa optimalnim koncentracijama LDL-H koncentracija PCSK9 u negativnoj korelaciji sa relativnim udelom LDL IV subfrakcija, kao i sa ukupnim udelom malih, gustih LDL čestica. Nasuprot tome, u grupi sa povišenim koncentracijama LDL-H nije utvrđena korelacija između PCSK9 i malih, gustih LDL čestica.

Kod pacijenata sa optimalnim koncentracijama LDL-H PCSK9 je pozitivno korelirao sa udelom HDL 3a, a negativno sa udelom HDL 2b subfrakcija i dijametrom HDL čestica. Slično, kod pacijenata sa povišenim koncentracijama LDL-H utvrđena je pozitivna korelacija koncentracije PCSK9 sa udelom HDL 3c subfrakcija, a negativna korelacija sa udelom HDL 2b čestica (Tabela 38).

Tabela 38. Korelacije koncentracija PCSK9 sa veličinom i raspodelom lipoproteinskih subfrakcija kod pacijenata sa T1DM u odnosu na koncentraciju LDL-H

Parametar	Optimalan LDL-H		Povišen LDL-H	
	R	P	R	P
LDL dijametar, nm	0,085	0,295	-0,023	0,877
LDL I, %	0,139	0,085	-0,146	0,320
LDL II, %	0,147	0,068	0,066	0,655
LDL III, %	-0,077	0,342	0,241	0,098
LDL IV,%	-0,217	<0,01	-0,064	0,655
Male, guste LDL, %	-0,203	<0,05	0,072	0,620
HDL dijametar, nm	-0,174	<0,05	-0,245	0,093
HDL 2b, %	-0,162	<0,05	-0,248	<0,05
HDL 2a, %	-0,066	0,414	0,034	0,820
HDL 3a, %	0,251	<0,05	-0,001	0,996
HDL 3b, %	0,029	0,719	0,064	0,668
HDL 3c, %	0,075	0,353	0,412	<0,01

Prikazani su rezultati Pearson-ove korelacione analize.

4.5.5. Korelacije PCSK9 i malih, gustih LDL čestica sa indeksom insulinske rezistencije

U cilju procene insulinske rezistencije svim pacijentima je izračunat indeks eGDR. Prosečna vrednost eGDR indeksa u ispitivanoj grupi iznosila je $9,9 \pm 1,1$. Korelacije koncentracija PCSK9 i udela malih, gustih LDL čestica sa eGDR u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole su prikazane u tabeli 39, a sa dnevnom dozom insulina u tabeli 40.

Tabela 39. Korelacije koncentracija PCSK9 i udela malih, gustih LDL čestica sa eGDR u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole

eGDR	Dobra metabolička kontrola		Suboptimalna i loša metabolička kontrola	
	R	P	R	P
PCSK9, ng/mL	-0,223	<0,05	-0,276	<0,01
Male, guste LDL čestice, %	0,184	0,111	-0,089	0,378

Prikazani su rezultati Pearson-ove korelacione analize.

Kod obe grupe pacijenata sa T1DM eGDR indeks je bio u inverznoj korelaciji sa koncentracijom PCSK9, a korelacije sa udelom malih, gustih LDL čestica nisu bile statistički značajne.

Tabela 40. Korelacije koncentracija PCSK9 i udela malih, gustih LDL čestica sa dnevnom dozom insulina u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole

Doza insulina, IU/kg/dan	Dobra metabolička kontrola		Suboptimalna i loša metabolička kontrola	
	R	P	R	P
PCSK9, ng/mL	0,022	0,856	0,200	<0,05
Male, guste LDL čestice, %	-0,240	<0,05	-0,065	0,493

Prikazani su rezultati Pearson-ove korelacione analize.

U grupi pacijenata sa dobrom metaboličkom kontrolom dnevna doza insulina je negativno korelirala sa relativnim udelom malih, gustih LDL čestica, dok ova asocijacija nije bila statistički značajna kod pacijenata sa suboptimalnom i lošom metaboličkom kontrolom.

4.5.6. Markeri inflamacije kod pacijenata sa T1DM u odnosu na postignutu metaboličku kontrolu

Naposletku, analizirali smo i gensku ekspresiju (Tabela 41) i koncentracije inflamatornih markera (Tabela 42) kod pacijenata sa T1DM u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole.

Tabela 41. Genska ekspresija TGF- β 1 i RAGE kod pacijenata sa T1DM u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole

Parametar	Metabolička kontrola			P
	Dobra	Suboptimalna	Loša	
TGF- β 1 iRNK	1,00 (0,79-1,73)	0,83 (0,69-1,13) ^{aa}	0,81 (0,74-1,13) ^{aa}	<0,01
RAGE iRNK	1,11 (0,82-1,60)	0,84 (0,69-1,08) ^{aa}	1,05 (0,76-1,09) ^b	<0,01

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Kruskal-Wallis testom i Mann-Whitney U *post hoc* testom.

^a Značajna razlika u odnosu na pacijente sa dobrom metaboličkom kontrolom (^{aa} $P < 0,01$);

^b Značajna razlika u odnosu na pacijente sa suboptimalnom metaboličkom kontrolom (^b $P < 0,05$).

Tabela 42. Koncentracije inflamatornih markera kod pacijenata sa T1DM u zavisnosti od postignute metaboličke kontrole

Parametar	Metabolička kontrola			P
	Dobra	Suboptimalna	Loša	
hsCRP, mg/L	0,50 (0,20-0,90)	0,70 (0,30-1,40)	0,90 (0,50-2,40) ^{aa}	<0,001
TGF- β 1, ng/mL	23,24 (14,11-33,15)	32,11 (22,81-41,14) ^{aa}	30,31 (18,38-43,23) ^{aa}	<0,01
sRAGE, ng/mL	1,32 (1,05-1,60)	1,72 (1,29-2,21) ^{aa}	1,47 (1,08-2,07) ^a	<0,001

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Kruskal-Wallis testom i Mann-Whitney U *post hoc* testom.

^a Značajna razlika u odnosu na pacijente sa dobrom metaboličkom kontrolom (^a $P < 0,05$; ^{aa} $P < 0,01$);

^b Značajna razlika u odnosu na pacijente sa suboptimalnom metaboličkom kontrolom (^b $P < 0,05$; ^{bb} $P < 0,01$).

Rezultati su pokazali značajno smanjenje genske ekspresije TGF- β 1 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi sa pogoršanjem metaboličke kontrole. Pacijenti sa suboptimalnom i lošom metaboličkom kontrolom su imali značajno niže nivoe TGF- β 1 iRNK od pacijenata sa dobrom metaboličkom kontrolom. Najnižu ekspresiju RAGE gena imali su pacijenti sa suboptimalnom metaboličkom kontrolom (Tabela 41). Koncentracije TGF- β 1 i sRAGE u plazmi pacijenata sa dobrom metaboličkom kontrolom bile su značajno niže od koncentracija kod pacijenata sa suboptimalnom i lošom metaboličkom kontrolom. Utvrđen je i značajan porast koncentracija hsCRP-a sa pogoršanjem metaboličke kontrole u T1DM (Tabela 42)

4.6. Uticaj pridruženih autoimunskih bolesti na lipidne markere ateroskleroze

U ispitivanom uzorku pacijenata sa T1DM prevalenca CB je iznosila 7,5%, a prevalenca ATD 14,9%. U tabeli 43 su prikazani demografski podaci pacijenata sa T1DM, u zavisnosti od toga da li imaju pridružene autoimunske bolesti.

Tabela 43. Demografski podaci pacijenata sa T1DM sa i bez pridruženih autoimunskih bolesti

Parametar	T1DM	T1DM+CB	T1DM+ATD	P
N	156	15	30	
Uzrast, godine	14,2 \pm 2,7	13,0 \pm 4,5	14,3 \pm 2,8	0,289
Pol (dečaci/devojčice), %	51,9/48,1	60/40	50/50	0,807
Trajanje dijabetesa, godine #	7,0 (5,0-9,0)	5,0 (3,0-7,0)	6,0 (5,0-9,0)	0,320
Uzrast pri postavljanju dijagnoze, godine #	7,0 (4,0-9,0)	10,0 (2,0-11,0)	6,5 (4,0-11,0)	0,884
Sistolni pritisak, mm Hg #	110,0 (92,0-115,0)	110,0 (92,0-115,0)	110,0 (100,0-117,5)	0,826
Dijastolni pritisak, mm Hg #	65,0 (60,0-70,0)	60,0 (55,0-70,0)	60,0 (60,0-70,0)	0,542

Kontinuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije i poređeni ANOVA testom.

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Kruskal-Wallis-ovim testom.

Analizirane grupe pacijenata se međusobno nisu razlikovale po uzrastu i polu. Takođe, nije bilo razlike u uzrastu pri kom je postavljena dijagnoza osnovne bolesti i dužini trajanja bolesti između pacijenata koji nemaju i onih koji imaju pridruženu CB ili ATD. Konačno, vrednosti sistolnog i dijastolnog pritiska se nisu značajno razlikovale između posmatranih grupa.

Kao što se može videti u tabeli 44, koncentracije glukoze i udeli HbA_{1c} kod pacijenata sa i bez pridruženih autoimunskih bolesti se nisu značajno razlikovali. U skladu sa prethodnim, nije bilo razlike u ekskreciji albumina urinom između posmatranih grupa, niti se razlikovao broj pacijenata kod kojih je utvrđeno rano povećanje ($\geq 7,5$ μ g/min) ekskrecije. Učestalost pacijenata sa lošom metaboličkom kontrolom je bila najmanja u grupi sa T1DM+CB.

Tabela 44. Parametri metaboličke kontrole pacijenata sa T1DM sa i bez pridruženih autoimunskih bolesti

Parametar	T1DM	T1DM+CB	T1DM+ATD	P
Glukoza, mmol/L	11,65 ± 4,59	10,21 ± 5,42	10,83 ± 3,81	0,391
HbA _{1c} , % [#]	7,8 (7,1-8,6)	7,5 (6,9-8,0)	7,6 (7,2-8,5)	0,542
Loša metabolička kontrola, %	18,1	6,7	13,3	0,818
eAG, mmol/L	10,29 ± 4,76	8,99 ± 1,53	9,96 ± 2,12	0,544
Urinarna ekskrecija albumina, µg/min [#]	4,2 (2,9-7,6)	3,1 (2,5-3,8)	4,7 (2,7-6,6)	0,242
Urinarna ekskrecija albumina ≥ 7,5 µg/min, %	24,4	18,2	18,5	0,793

Kontinuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni ANOVA testom. Kategorički podaci su prikazani kao relativne frekvence i poređeni Chi-kvadrat testom.

[#] Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Kruskal-Wallis-ovim testom.

U tabeli 45 su prikazane koncentracije markera inflamacije i parametara tireoidnog statusa kod ispitivanih grupa. Nije bilo značajne razlike u koncentracijama hsCRP-a i mokraćne kiseline. Kao što se i moglo očekivati, koncentracije TSH and TPO-At u T1DM+ATD grupi su bile značajno više nego u grupama sa T1DM i T1DM+CB.

Tabela 45. Parametri inflamacije i tireoidnog statusa

Parametar	T1DM	T1DM+CB	T1DM+ATD	P
Mokraćna kiselina, µmol/L	218,98 ± 53,10	245,20 ± 57,19	218,17 ± 52,55	0,187
hsCRP, mg/L [#]	0,70 (0,30-1,60)	0,60 (0,25-2,20)	0,70 (0,30-1,40)	0,191
TSH, mU/L [#]	2,60 (1,79-3,55) ^b	2,47 (1,48-4,27)	4,04 (1,96-6,28)	<0,05
fT4, pmol/L [#]	15,50 (14,11-16,89)	17,23 (14,62-19,19)	15,84 (14,05-17,16)	0,127
TPO-At, U/L [#]	10,0 (7,3-15,7) ^{bb}	13,7 (9,6-38,2) ^{bb}	270,4 (115,6-441,2)	<0,001

[#] Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Kruskal-Wallis-ovim testom i Mann-Whitney U *post hoc* testom.

^b Značajna razlika u odnosu na T1DM+ATD grupu: ^b P<0,05; ^{bb} P<0,01.

Koncentracije LDL-H u grupama sa T1DM+CB i T1DM+ATD su bile više nego u grupi koja je imala samo T1DM, ali razlika nije bila statistički značajna ($P=0,442$). Pacijenti sa CB i ATD su imali značajno niže koncentracije HDL-H od pacijenata bez pridruženih autoimunskih bolesti (Tabela 46).

Tabela 46. Parametri lipidnog statusa pacijenata sa T1DM sa i bez pridruženih autoimunskih bolesti

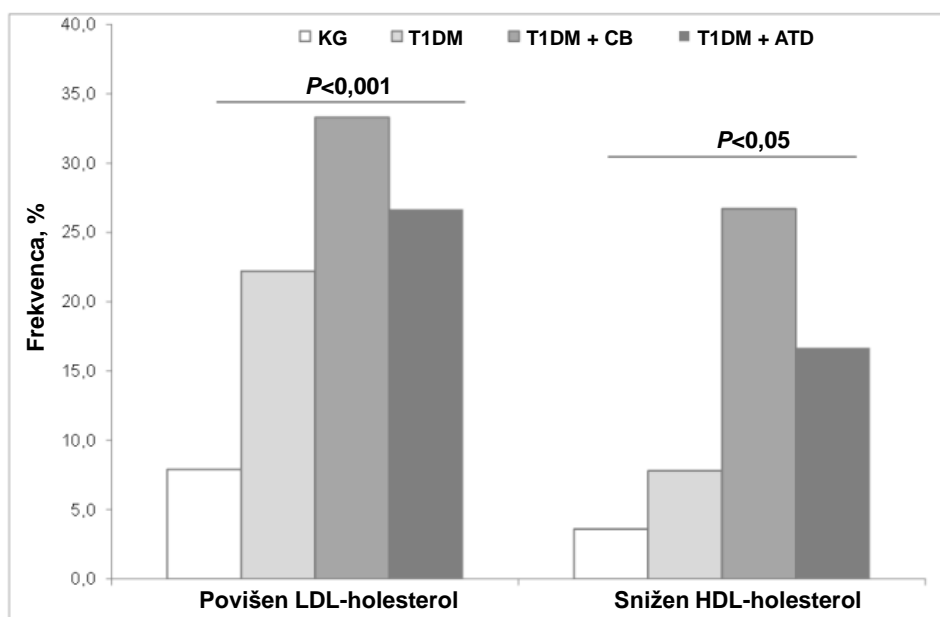
Parametar	T1DM	T1DM+CB	T1DM+ATD	<i>P</i>
Ukupan holesterol, mmol/L	4,21 ± 0,84	4,05 ± 0,47	4,22 ± 1,23	0,802
TG, mmol/L [#]	0,74 (0,60-0,93)	0,71 (0,45-0,80)	0,68 (0,56-0,79)	0,701
LDL-H, mmol/L	2,14 ± 0,69	2,24 ± 0,56	2,32 ± 1,09	0,442
HDL-H, mmol/L	1,69 ± 0,38 ^a	1,46 ± 0,45	1,55 ± 0,29	<0,05

Kontinuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni ANOVA testom.

[#] Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Kruskal-Wallis-ovim testom i Mann-Whitney *U post hoc* testom.

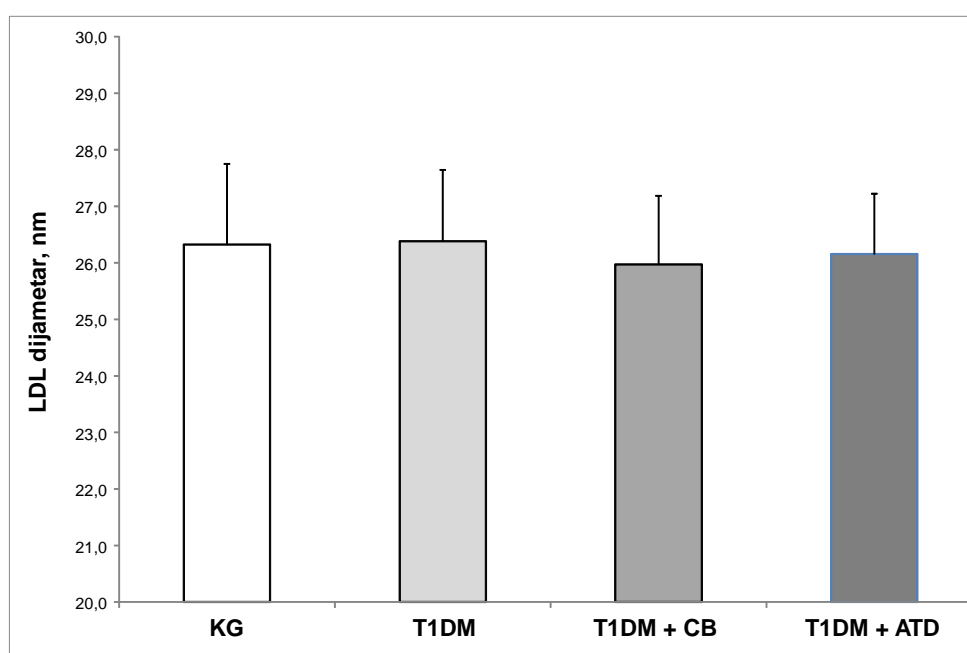
^a Značajna razlika u odnosu na T1DM+CB grupu: ^a $P<0,05$.

Na slici 19 je prikazana učestalost dislipidemije u KG i u ispitivanim grupama pacijenata sa T1DM. Kriterijum za povišenu koncentraciju LDL-H u KG bila je vrednost >3,36 mmol/L, a kod pacijenata sa T1DM >2,6 mmol/L. Za snižene koncentracije HDL-H u KG smatrali smo vrednosti koje su bile <0,9 mmol/L, a u grupi pacijenata vrednosti <1,15 mmol/L kod dečaka i vrednosti <1,29 mmol/L kod devojčica. Na osnovu ovih kriterijuma, utvrdili smo da 7,9% ispitanika u KG ima povišene koncentracije LDL-H. Učestalost pacijenata sa povišenim koncentracijama LDL-H u T1DM grupi iznosila je 22,1%, u T1DM+CB grupi 35,7%, a u T1DM+ATD grupi 26,7%. Ove frekvence su bile statistički značajno više nego u KG ($P<0,001$). U svim grupama sa T1DM bilo je značajno više ($P<0,05$) pacijenata sa sniženim koncentracijama HDL-H, nego u KG (3,6%). Konkretno, u grupi koja je imala samo T1DM učestalost je iznosila 8,4%, dok je u grupi sa T1DM+CB bila 21,4%, a u grupi sa T1DM+ATD 16,7%. Hipertrigliceridemiju (TG >1,69 mmol/L) je imalo 3,6% ispitanika u KG i 3,9% pacijenata u grupi koja je imala samo T1DM, a pacijenti sa T1DM+CB i T1DM+ATD nisu imali hipertrigliceridemiju ($P=0,625$).



Slika 19. Učestalost pacijenata sa povišenim koncentracijama LDL-H i sniženim koncentracijama HDL-H u ispitivanim grupama pacijenata sa T1DM i KG

Kao što se može videti na slici 20 i u tabeli 47, dijametri LDL čestica se nisu značajno razlikovali između KG i grupa T1DM pacijenata sa i bez pridruženih autoimunskih bolesti ($P=0,619$). Sa druge strane, dijametri HDL čestica su bili značajno sniženi u grupama pacijenata sa pridruženim autoimunskim bolestima (Slika 21, Tabela 48). *Post hoc* analiza je pokazala da su HDL dijametri u T1DM+CB grupi značajno manji od dijametara u grupi pacijenata koji imaju samo T1DM ($10,09 \pm 0,88$ nm; $P<0,05$) i u KG ($10,21 \pm 1,02$ nm; $P<0,05$).

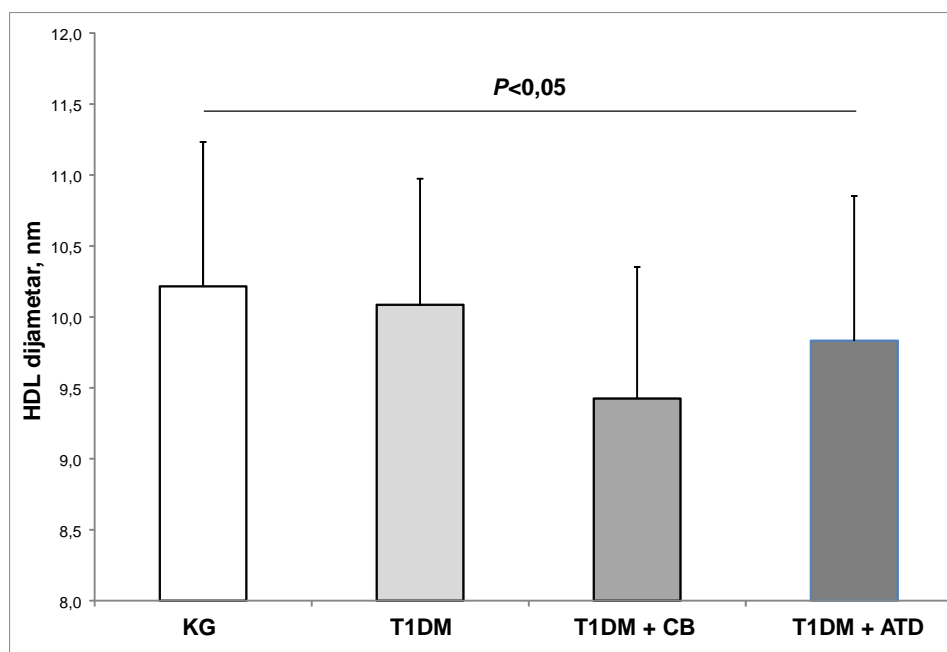


Slika 20. Dijametri LDL čestica u ispitivanim grupama pacijenata sa T1DM i KG

Tabela 47. Veličina i raspodela LDL subfrakcija kod pacijenata sa T1DM sa i bez pridruženih autoimunskih bolesti

	T1DM	T1DM+CB	T1DM+ATD	P
LDL dijametar, nm	26,38 ± 1,26	25,97 ± 1,21	26,15 ± 1,07	0,619
LDL dijametar < 25,5 nm, %	25,8	42,9	33,3	0,314
LDL subfrakcije, %				
LDL I	23,3 ± 7,8	23,5 ± 5,5	22,4 ± 7,0	0,846
LDL II	28,0 ± 6,0	27,4 ± 4,6	26,5 ± 4,8	0,430
LDL III	20,9 ± 4,7	21,2 ± 4,3	21,5 ± 5,6	0,815
LDL IV	27,4 ± 7,8	27,9 ± 4,5	29,6 ± 9,5	0,390
Male, guste LDL čestice, %	48,6 ± 9,6	49,1 ± 8,1	51,1 ± 9,3	0,430

Kontinuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni ANOVA testom. Kategorički podaci su prikazani kao relativne frekvence i poređeni Chi-kvadrat testom.



Slika 21. Dijametri HDL čestica u ispitivanim grupama pacijenata sa T1DM i KG

Tabela 48. Veličina i raspodela HDL subfrakcija u ispitivanim grupama

	T1DM	T1DM+CB	T1DM+ATD	<i>P</i>
HDL dijametar, nm	10,09 ± 0,89 ^a	9,42 ± 0,93	9,83 ± 1,02	<0,05
HDL dijametar < 8,8 nm, %	19,4	42,9	23,3	0,119
HDL subfrakcije:				
HDL 2b, %	41,9 ± 8,2	39,2 ± 10,0	42,2 ± 7,9	0,470
HDL 2a, %	20,8 ± 3,9	20,0 ± 2,6	21,9 ± 3,6	0,225
HDL 3a, %	17,1 ± 4,6	19,2 ± 7,3	16,9 ± 4,0	0,267
HDL 3b, %	11,1 ± 5,0	11,6 ± 5,0	9,6 ± 3,8	0,255
HDL 3c, %	9,0 ± 4,2	10,1 ± 3,6	9,4 ± 5,4	0,589
Male HDL čestice, %	37,3 ± 8,2	40,9 ± 9,1	35,9 ± 8,9	0,077

Kontinuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti ± standardne devijacije i poređeni ANOVA testom i Tukey *post hoc* testom. Kategorički podaci su prikazani kao relativne frekvence i poređeni Chi-kvadrat testom.
^a Značajna razlika u odnosu na T1DM+CB grupu: ^a *P*<0,05.

Distribucija LDL subfrakcija u ispitivanim grupama pacijenata sa T1DM se nije značajno razlikovala (Tabela 47). Iako nismo utvrdili značajne razlike u udelima pojedinačnih HDL subfrakcija između grupa (Tabela 48), ukupan udeo HDL 2 subfrakcija u KG (69,1 ± 7,6%) bio je značajno viši od udela u grupama sa T1DM+CB (59,1 ± 9,1%; *P*<0,001), T1DM+ATD (64,1 ± 8,9%; *P*<0,05) i u grupi koja je imala samo T1DM (62,7 ± 8,2%; *P*<0,001). U skladu sa prethodnim, u sve tri grupe pacijenata udeo malih HDL čestica (Tabela 48) je bio značajno viši (*P*<0,001) nego u KG (30,9 ± 7,6%).

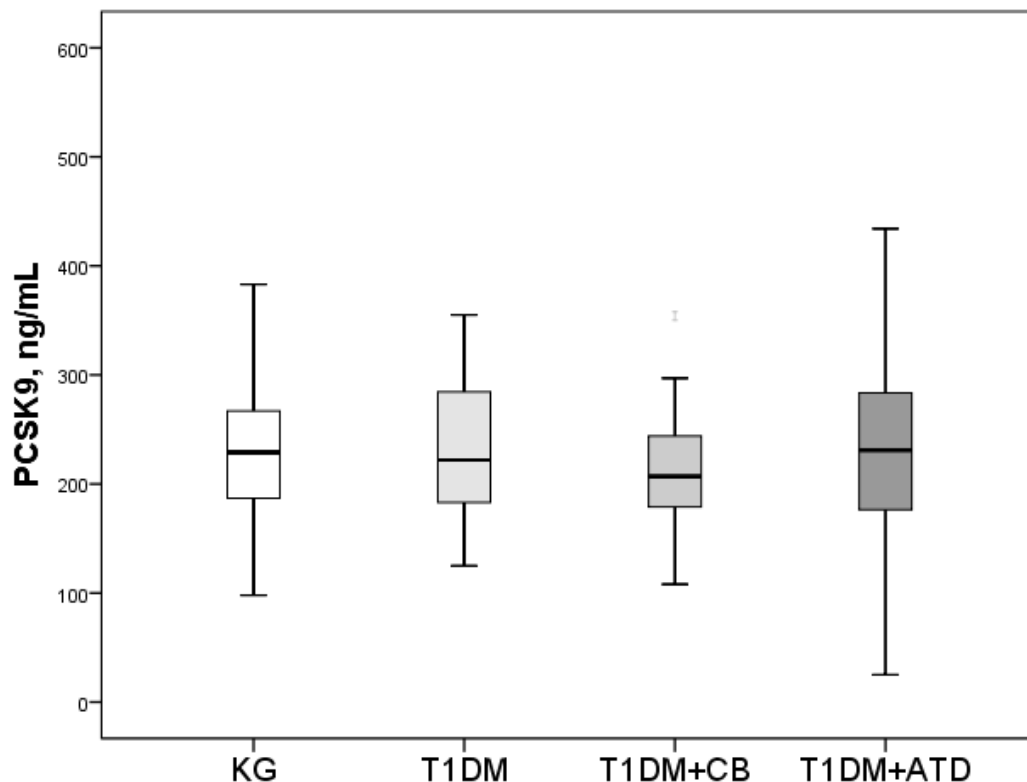
U nastavku smo uporedili vrednosti indeksa ateroskleroze (LDL-H/HDL-H) u posmatranim grupama pacijenata sa T1DM. Najniže vrednosti ovog indeksa su imali T1DM pacijenti bez pridruženih autoimunskih bolesti ($1,33 \pm 0,51$). Prosečna vrednost indeksa ateroskleroze u T1DM+CB grupi iznosila je $1,54 \pm 0,74$. U grupi sa T1DM+CB vrednosti indeksa ateroskleroze su bile najviše ($1,75 \pm 0,86$). Statistički značajna razlika je potvrđena između T1DM i T1DM+CB grupe ($P < 0,05$).

Zatim je urađena linearna regresiona analiza (Tabela 49) da bi se ispitala povezanost indeksa ateroskleroze sa kliničkim i laboratorijskim parametrima pacijenata sa T1DM. Rezultati univarijantne analize su pokazali da je indeks ateroskleroze u pozitivnoj korelaciji sa ITM, udelom HbA_{1c} i koncentracijama TG i TPO-At. Nakon što su sve promenljive koje su značajno korelirale ($P < 0,01$) sa indeksom ateroskleroze u univarijantnoj analizi uključene u multivarijantnu analizu, koncentracije TG i TPO-At su ostale značajni, nezavisni prediktori indeksa ateroskleroze.

Tabela 49. Rezultati univarijantne i multivarijantne linearne regresione analize asocijacija sa indeksom ateroskleroze kod pacijenata sa T1DM

Varijable	Univariantna analiza		Multivarijantna analiza	
	R	P	R	P
TG, mmol/L	0,396	<0,001	0,356	<0,001
HbA _{1c} , %	0,206	<0,01	0,047	0,551
ITM, kg/m ²	0,184	<0,01	0,138	0,068
TPO-At, U/L	0,148	<0,01	0,171	<0,05
hsCRP, mg/L	0,130	0,070	0,008	0,919

Na slici 22 su prikazane koncentracije PCSK9 kod pacijenata sa T1DM u odnosu na pridružene autoimunske bolesti i u KG. Najviše koncentracije PCSK9 su imali pacijenti sa T1DM+ATD (medijana: 231,00 ng/mL; interkvartilni raspon: 176,50-283,50 ng/mL), a najniže pacijenti sa T1DM+CB (medijana: 207,00 ng/mL; interkvartilni raspon: 179,00-244,00 ng/mL). Kod T1DM pacijenata koji nisu imali pridružene autoimunske bolesti medijalna koncentracija PCSK9 iznosila je 229,00 ng/mL, a interkvartilni raspon 183,00-284,50 ng/mL. Razlika između posmatranih grupa nije bila statistički značajna ($P=0,376$).



Slika 22. Koncentracije PCSK9 u ispitivanim grupama pacijenata sa T1DM u KG

Sa ciljem da se utvrdi da li pridružene autoimunske bolesti utiču na rizik za razvoj dislipidemije u T1DM urađena je binarna logistička analiza. Rizična grupa je formirana od pacijenata sa T1DM+CB i T1DM+ATD, a pacijenti koji su imali samo T1DM činili su referentnu grupu. Najpre smo utvrdili da prisustvo CB i ATD nije značajno povezano sa povišenim koncentracijama LDL-H u T1DM (OR: 1,42; 95% CI: 0,67-3,01; $P=0,357$).

Potom je analizirana povezanost prisustva CB i ATD sa sniženim koncentracijama HDL-H u T1DM (Tabela 50). Analiza je pokazala da je verovatnoća da pacijenti imaju snižene koncentracije HDL-H oko 3 puta veća (OR: 2,96; $P<0,05$) ukoliko je T1DM udružen sa CB ili ATD. U multivarijantnoj analizi kreirano je 6 modela sa ciljem da se izvrši korekcija za: uzrast, pol i stadijum puberteta (model 1), dužinu trajanja dijabetesa i udeo HbA_{1c} (model 2), koncentraciju TG i ITM (model 3), koncentracije TSH (model 4) i hsCRP-a (model 5) i urinarnu ekskreciju albumina (model 6). Nakon korekcije za demografske karakteristike, kao i za parametre metaboličke kontrole, tireoidnog i statusa inflamacije, pacijenti sa udruženim autoimunskim bolestima su i dalje imali veću verovatnoću za snižene koncentracije HDL-H. Veza između prisustva CD i ATD i sniženih koncentracija HDL-H je bila na granici statističke značajnosti ($P=0,054$) nakon korekcije za urinarnu ekskreciju albumina.

Tabela 50. Povezanost prisustva CB i ATD sa sniženim koncentracijama HDL-holesterola u T1DM

Zavisna promenljiva	OR (95% CI)	<i>P</i>
Prisustvo CD ili ATD	2,96 (1,16-7,56)	<0,05
Korekcija za:		
Model 1 (uzrast, pol i stadijum puberteta)	3,02 (1,18-7,75)	<0,05
Model 2 (trajanje djabetesa i HbA _{1c})	3,15 (1,22-8,18)	<0,05
Model 3 (ITM and TG)	3,23 (1,24-8,39)	<0,05
Model 4 (hsCRP)	3,10 (1,92-8,08)	<0,05
Model 5 (TSH)	3,49 (1,15-10,63)	<0,05
Model 6 (urinarna ekskrecija albumina)	3,15 (0,98-10,13)	0,054

4.7. Povezanost ranih lipidnih i inflamatornih markera ateroskleroze sa razvojem komplikacija T1DM

Imajući u vidu da su u ovo istraživanje uključeni pacijenti sa T1DM kod kojih kliničkim pregledom nije utvrđeno prisustvo komplikacija, potencijalni značaj određivanja lipidnih i inflamatornih markera za razvoj komplikacija analiziran je na osnovu ekskrecije albumina u urinu. Povezanost lipidnih i inflamatornih markera sa urinarnom ekskrecijom albumina analizirana je u grupi od 156 pacijenata sa T1DM, nakon što su iz originalnog uzorka izuzeti pacijenti sa pridruženim autoimunskim bolestima (n=45). Pošto u ispitivanoj grupi nije bilo pacijenata sa mikroalbuminurijom, analiza je nastavljena podelom pacijenata na osnovu kvartilnih vrednosti za urinarnu ekskreciju albumina u uzorku (Tabela 51).

Tabela 51. Demografske karakteristike pacijenata sa T1DM po kvartilima urinarne ekskrecije albumina

Parametar	Urinarna ekskrecija albumina ($\mu\text{g}/\text{min}$)				P
	I kvartil ($\leq 2,9$)	II kvartil (3,0-4,2)	III kvartil (4,3-7,4)	IV kvartil ($\geq 7,5$)	
Uzrast, godine	12,7 \pm 3,5	15,3 \pm 3,3 ^a	14,7 \pm 2,6 ^a	15,3 \pm 2,0 ^a	<0,01
Pol (muški/ženski), %	51,6/48,4	41,9/58,1	48,4/51,6	64,5/35,5	0,340
Trajanje dijabetesa, godine [#]	8,0 (6,0-8,0)	7,0 (5,0-8,0)	7,0 (5,0-8,0)	8,0 (6,0-9,0)	0,320
Uzrast pri postavljanju dijagnoze, godine [#]	6,0 (3,0-6,5)	8,0 ^a (5,0-11,0)	8,0 ^a (5,0-10,0)	8,0 ^a (5,0-9,0)	<0,05
ITM, kg/m^2	19,1 \pm 3,3	20,9 \pm 3,2	21,6 \pm 4,6	20,6 \pm 3,3	0,060
Sistolni pritisak, mm Hg [#]	105 (100-110)	105 (100-110)	110 (105-120)	110 (100-115)	0,076
Dijastolni pritisak, mm Hg [#]	60 (60-70)	70 (60-70)	70 (60-77)	65 (60-70)	0,106

Kontinuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije i poređeni ANOVA testom i Tukey *post hoc* testom. Kategorički podaci su prikazani kao relativne frekvence i poređeni Chi-kvadrat testom. [#] Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Kruskal-Wallis-ovim testom i Mann-Whitney U *post hoc* testom.

^a Značajna razlika u odnosu na I kvartil: ^a $P < 0,05$.

Kao što se može videti u tabeli 51, pacijenti čija je ekskrecija albumina u urinu odgovarala I kvartilu raspodele bili su značajno mlađi od pacijenata u ostalim kvartilnim grupama. Pored toga, ova analiza je pokazala da je pacijentima u I kvartilu dijagnoza T1DM postavljena znatno ranije nego pacijentima iz ostalih kvartilnih grupa.

Tabela 52. Biohemijski parametri pacijenata sa T1DM po kvartilima urinarne ekskrecije albumina

Parametar	Urinarne ekskrecija albumina ($\mu\text{g}/\text{min}$)				P
	I kvartil ($\leq 2,9$)	II kvartil (3,0-4,2)	III kvartil (4,3-7,4)	IV kvartil ($\geq 7,5$)	
Glukoza, mmol/L	11,63 \pm 5,17	15,27 \pm 4,66	12,06 \pm 4,89	10,92 \pm 4,01	0,815
HbA _{1c} , % #	7,8 (7,3-8,5)	7,5 (7,1-8,2)	7,7 (6,6-8,8)	7,9 (7,1-8,7)	0,489
Ukupan holesterol, mmol/L	4,47 \pm 1,17	4,15 \pm 0,69	4,22 \pm 0,74	3,94 \pm 0,51	0,087
TG, mmol/L #	0,70 (0,56-0,89)	0,66 (0,57-0,84)	0,80 (0,65-0,93)	0,74 (0,61-0,93)	0,554
LDL-H, mmol/L	2,37 \pm 0,86	2,13 \pm 0,61	2,15 \pm 0,57	1,85 \pm 0,45 ^a	<0,05
HDL-H, mmol/L	1,75 \pm 0,43	1,68 \pm 0,33	1,69 \pm 0,42	1,63 \pm 0,35	0,661
Urea, mmol/L	2,37 \pm 0,86	2,13 \pm 0,61	2,15 \pm 0,57	1,85 \pm 0,45	0,580
Kreatinin, $\mu\text{mol}/\text{L}$ #	70,0 (61,0-75,0)	75,0 ^{aa} (70,0-85,0)	79,6 ^{aa} (73,5-86,2)	76,8 ^{aa} (72,1-89,1)	<0,01
JGF, mL/min/1,73m ² #	81,7 (76,7-88,2)	79,8 (73,3-85,9)	77,0 (67,0-87,0)	79,5 (73,0-87,70)	0,322
hsCRP, mg/L #	0,70 (0,30-1,40)	0,75 (0,30-1,60)	0,70 (0,40-1,60)	0,70 (0,40-1,40)	0,967

Kontinuirani podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije i poređeni ANOVA testom i Tukey *post hoc* testom. Kategorički podaci su prikazani kao relativne frekvence i poređeni Chi-kvadrat testom. # Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Kruskal-Wallis-ovim testom i Mann-Whitney U *post hoc* testom.

^a Značajna razlika u odnosu na I kvartil: ^a $P < 0,05$, ^{aa} $P < 0,01$.

Analiza biohemijskih parametara je pokazala da sa porastom urinarne ekskrecije albumina raste i koncentracija kreatinina u serumu. Utvrdili smo da pacijenti u IV kvartilu imaju statistički značajno niže koncentracije LDL-H od pacijenata u ostalim kvartilnim grupama. Koncentracija glukoze i udeo HbA_{1c} se nisu značajno razlikovali između grupa (Tabela 52).

Tabela 53. Veličina i raspodela LDL subfrakcija kod pacijenata sa T1DM po kvartilima urinarne ekskrecije albumina

Parametar	Urinarna ekskrecija albumina ($\mu\text{g}/\text{min}$)				<i>P</i>
	I kvartil ($\leq 2,9$)	II kvartil (3,0-4,2)	III kvartil (4,3-7,4)	IV kvartil ($\geq 7,5$)	
LDL dijametar, nm	25,8 \pm 1,4	26,3 \pm 1,1	26,5 \pm 1,0	26,8 \pm 0,9 ^a	<0,01
LDL I, %	22,4 \pm 7,3	23,0 \pm 8,5	21,9 \pm 6,1	25,2 \pm 8,5	0,333
LDL II, %	27,7 \pm 5,3	26,0 \pm 4,5	29,5 \pm 5,9	29,5 \pm 7,6	0,063
LDL III, %	21,9 \pm 6,6	21,1 \pm 4,0	21,0 \pm 3,4	19,5 \pm 3,7	0,176
LDL IV, %	28,0 \pm 6,8	29,9 \pm 8,2	27,6 \pm 6,1	25,7 \pm 7,5	0,156
Male, guste LDL, %	49,8 \pm 10,3	51,0 \pm 8,9	48,6 \pm 7,3	45,3 \pm 10,2	0,087

Podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije i poređeni ANOVA testom i Tukey *post hoc* testom.

^a Značajna razlika u odnosu na I kvartil: ^a $P < 0,05$.

Pacijenti čija je ekskrecija albumina u urinu odgovarala I kvartilu su imali značajno manje dijemetre LDL čestica od pacijenata u IV kvartilnoj grupi. Uočen je trend porasta relativnih udela LDL II subfrakcija i smanjenja udela malih, gustih LDL čestica sa porastom urinarne ekskrecije albumina, ali razlike nisu bile statistički značajne (Tabela 53).

U tabeli 54 je dat uporedni prikaz dijametara i distribucije HDL subfrakcija po kvartilima urinarne ekskrecije albumina. Utvdili smo da sa porastom ekskrecije albumina u urinu značajno raste relativni udeo HDL 3b subfrakcija, odnosno ukupni udeo malih HDL čestica.

Tabela 54. Veličina i raspodela HDL subfrakcija kod pacijenata sa T1DM po kvartilima urinarne ekskrecije albumina

Parametar	Urinarna ekskrecija albumina ($\mu\text{g}/\text{min}$)				<i>P</i>
	I kvartil ($\leq 2,9$)	II kvartil (3,0-4,2)	III kvartil (4,3-7,4)	IV kvartil ($\geq 7,5$)	
HDL dijametar, nm	10,2 \pm 0,7	10,2 \pm 0,9	9,8 \pm 1,0	10,0 \pm 0,9	0,146
HDL 2b, %	43,1 \pm 10,0	43,5 \pm 7,7	40,0 \pm 7,0	40,7 \pm 8,5	0,272
HDL 2a, %	22,3 \pm 6,5	20,6 \pm 3,1	20,3 \pm 3,1	20,6 \pm 3,5	0,264
HDL 3a, %	16,6 \pm 3,9	15,9 \pm 3,5	18,3 \pm 5,4	17,8 \pm 4,9	0,161
HDL 3b, %	8,8 \pm 2,6	12,0 \pm 5,3	12,2 \pm 6,3 ^a	12,2 \pm 5,9 ^a	<0,05
HDL 3c, %	9,2 \pm 5,2	7,8 \pm 4,0	9,2 \pm 3,7	8,8 \pm 3,8	0,535
Male HDL čestice, %	34,6 \pm 7,6	35,8 \pm 8,4	39,7 \pm 8,3	38,7 \pm 7,7	<0,05

Podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardne devijacije i poređeni ANOVA testom i Tukey *post hoc* testom.

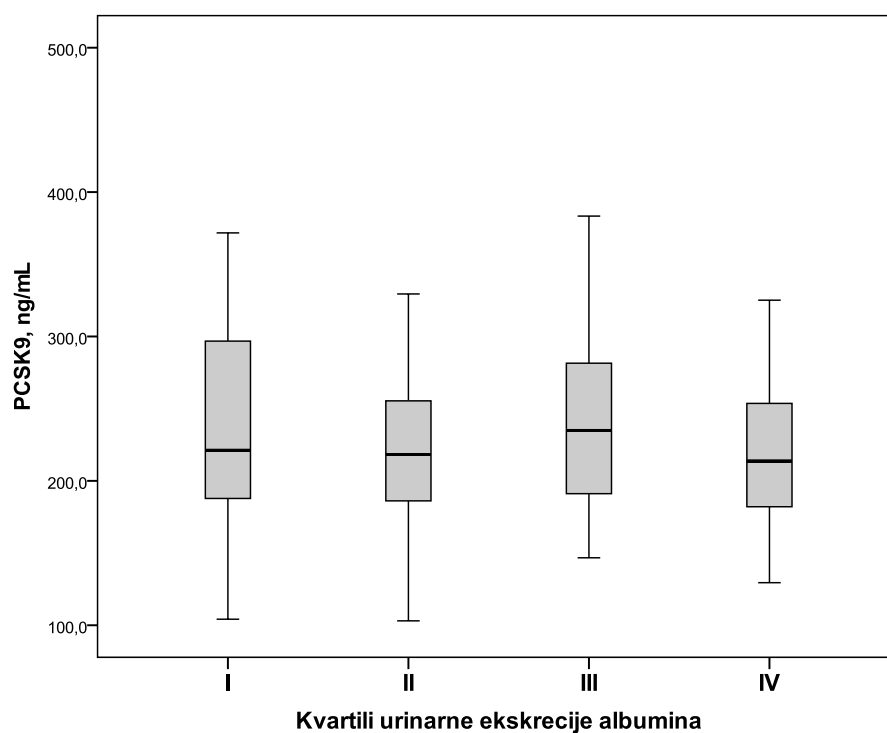
^a Značajna razlika u odnosu na I kvartil: ^a*P*<0,05.

Rezultati prikazani u tabeli 55 i na slici 23 pokazuju da se koncentracije PCSK9 nisu značajno razlikovale po kvartilima urinarne ekskrecije albumina.

Tabela 55. Koncentracije PCSK9 kod pacijenata sa T1DM po kvartilima urinarne ekskrecije albumina

Urinarna ekskrecija albumina ($\mu\text{g}/\text{min}$)	PCSK9, ng/mL
I kvartil ($\leq 2,9$)	221,15 (187,81-296,79)
II kvartil (3,0-4,2)	218,28 (186,15-255,41)
III kvartil (4,3-7,4)	235,59 (191,56-285,29)
IV kvartil ($\geq 7,5$)	213,65 (182,07-253,65)
<i>P</i>	0,678

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Kruskal-Wallis-ovim testom.



Slika 23. Koncentracije PCSK9 kod pacijenata sa T1DM po kvartilima urinarne ekskrecije albumina

Zatim smo analizirali gensku ekspresiju u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i koncentracije markera inflamacije. U tabeli 56 i na slici 24 (pod A i C) su dati nivoi iRNK za TGF- β 1 i RAGE, a u tabeli 57 i na slici 24 (pod B i D) su prikazane koncentracije TGF- β 1 i sRAGE u plazmi pacijenata sa T1DM po kvartilima urinarne ekskrecije albumina.

Tabela 56. Genska ekspresija TGF- β 1 i RAGE kod pacijenata sa T1DM po kvartilima urinarne ekskrecije albumina

Parametar	Urinarna ekskrecija albumina (μ g/min)				P
	I kvartil ($\leq 2,9$)	II kvartil (3,0-4,2)	III kvartil (4,3-7,4)	IV kvartil ($\geq 7,5$)	
TGF- β 1 iRNK	1,04 (0,75-1,35)	0,82 (0,75-1,02)	0,84 (0,76-1,08)	0,79 ^a (0,65-0,83)	<0,05
RAGE iRNK	1,03 (0,79-1,36)	0,90 (0,74-1,21)	1,02 (0,79-1,25)	0,86 (0,68-1,16)	0,264

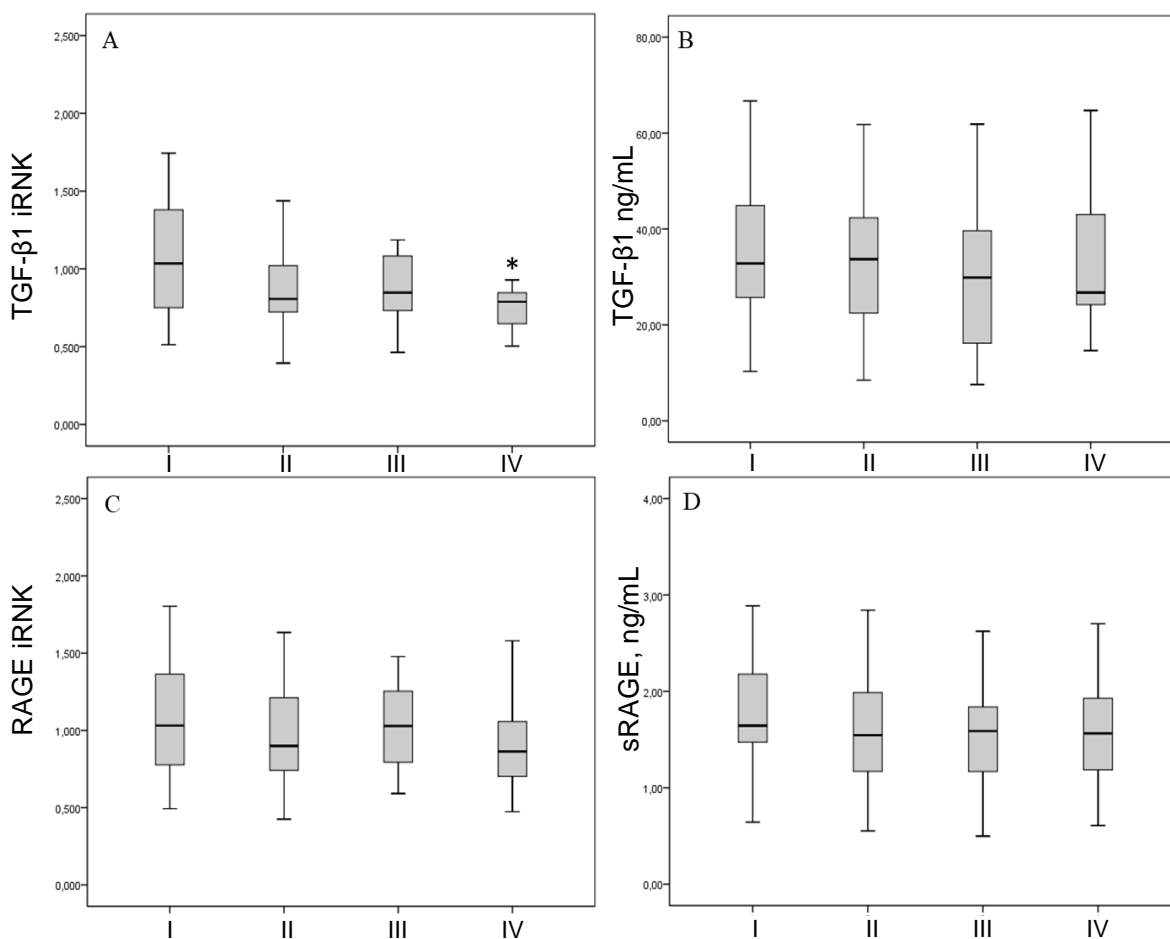
Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Kruskal-Wallis-ovim testom i Mann-Whitney *post hoc* testom.

^a Značajna razlika u odnosu na I kvartil: ^a $P < 0,05$.

Tabela 57. Koncentracije inflamatornih markera kod pacijenata sa T1DM po kvartilima urinarne ekskrecije albumina

Parametar	Urinarna ekskrecija albumina (μ g/min)				P
	I kvartil ($\leq 2,9$)	II kvartil (3,0-4,2)	III kvartil (4,3-7,4)	IV kvartil ($\geq 7,5$)	
TGF- β 1, ng/mL	32,21 (25,72-44,90)	33,71 (22,46-42,33)	26,82 (16,19-39,38)	26,57 (23,38-43,61)	0,975
sRAGE, ng/mL	1,59 (1,47-2,12)	1,55 (1,17-1,99)	1,58 (1,17-1,84)	1,54 (1,16-1,98)	0,629

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Kruskal-Wallis-ovim testom.



Kvartili urinarne ekskrecije albumina

Slika 24. Genska ekspresija u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i koncentracija inflamatornih markera u plazmi pacijenata sa T1DM po kvartilima urinarne ekskrecije albumina: A) Normalizovani nivoi TGF-β1 iRNAK; B) Koncentracije TGF-β1; C) Normalizovani nivoi RAGE iRNAK; D) Koncentracije sRAGE.

Podaci su prikazani kao medijane (interkvartilni rasponi) i poređeni Kruskal-Wallis-ovim testom i Mann-Whitney post hoc testom: *P<0,05.

Utvrđili smo da se nivoi TGF-β1 iRNAK značajno razlikuju po kvartilima urinarne ekskrecije albumina. Pacijenti čija je ekskrecija albumina u urinu odgovarala IV kvartilu ($\geq 7,5 \mu\text{g}/\text{min}$, što se smatra ranim povećanjem urinarne ekskrecije albumina koji prethodi mikroalbuminuriji), su imali značajno niže nivoe iRNAK za TGF-β1 od pacijenata u I kvartilu. Za razliku od genske ekspresije, koncentracije TGF-β1 u plazmi se nisu značajno razlikovale po kvartilima urinarne ekskrecije albumina. Takođe, nije bilo razlike ni u genskoj ekspresiji RAGE, kao ni u koncentracijama sRAGE u plazmi.

Tabela 58. Rezultati ordinalne logističke regresione analize

Nezavisne promenljive	OR (95%CI)	<i>P</i>	Nagelkerke <i>R</i> ²
hsCRP, mg/L	0,99 (0,89-1,09)	0,806	0,001
TGF-β1 iRNK	0,28 (0,13-0,61)	<0,01	0,140
TGF-β1, ng/mL	0,99 (0,97-1,02)	0,507	0,004
RAGE iRNK	0,61 (0,36-0,99)	<0,05	0,030
sRAGE, ng/mL	0,73 (0,42-1,27)	0,261	0,011
Model 1	Korigovani OR (95%CI)	<i>P</i>	Nagelkerke <i>R</i> ²
hsCRP, mg/L	0,98 (0,86-1,11)	0,735	0,177
TGF-β1 iRNK	0,34 (0,14-0,84)	<0,05	0,231
TGF-β1, ng/mL	0,98 (0,96-1,01)	0,112	0,193
RAGE iRNK	0,65 (0,35-1,22)	0,181	0,206
sRAGE, ng/mL	0,87 (0,47-1,64)	0,675	0,188
Model 2	Korigovani OR (95%CI)	<i>P</i>	Nagelkerke <i>R</i> ²
hsCRP, mg/L	0,99 (0,97-1,03)	0,280	
TGF-β1 iRNK	0,22 (0,07-0,74)	<0,05	
TGF-β1, ng/mL	0,97 (0,96-1,01)	0,320	0,220
RAGE iRNK	1,15 (0,51-2,64)	0,735	
sRAGE, ng/mL	0,87 (0,44-1,71)	0,679	

U modelu 1 je izvršena korekcija za: pol (0-ženski; 1-muški), uzrast, sistolni i dijastolni pritisak, kreatinin, hsCRP i HbA_{1c}.

U modelu 2 je izvršena korekcija za: pol (0-ženski; 1-muški), uzrast, sistolni i dijastolni pritisak, kreatinin, hsCRP, HbA_{1c} i koncentracije i nivoe iRNK TGF-β1 i RAGE.

U tabeli 58 su prikazani rezultati ordinalne logističke regresione analize, koja je urađena sa ciljem da se utvrdi da li ispitivani markeri inflamacije mogu da predvide rano povećanje urinarne ekskrecije albumina ($\geq 7,5$ $\mu\text{g}/\text{min}$). Utvrdili smo da su genska ekspresija TGF-β1 i iRNK RAGE značajno udruženi sa ranim povećanjem urinarne ekskrecije albumina.

U multivarijantnoj analizi je potvrđeno da je veza između nižih nivoa TGF-β1 iRNK i ranog povećanja ekskrecije albumina u urinu nezavisna od drugih varijabli koje su testirane u modelima 1 i 2 (Tabela 58). Konkretno, sa smanjenjem ekspresije gena za TGF-β1 za jednu jedinicu, verovatnoća za povećanje ekskrecije albumina u urinu je rasla za 66% (model 1), odnosno za 78% (model 2). Na osnovu vrednosti Nagelkerke *R*² koeficijenta utvrdili smo da model 1 objašnjava 23,1%, a model 2 objašnjava 22% varijacije u urinarnoj ekskreciji albumina (Tabela 58).

Uzimajući u obzir sve prethodne rezultate, kao i to da su se jedino nivoi genske ekspresije i koncentracije markera inflamacije u plazmi značajno razlikovali između pacijenata sa T1DM i ispitanika u KG (Slika 14, Tabele 15 i 16), na kraju smo analizirali potencijalnu nezavisnu povezanost ispitivanih markera inflamacije sa T1DM. U tu svrhu urađena je binarna logistička regresiona analiza (Tabela 59), koja je u univarijantnoj analizi pokazala da su nivoi iRNK i koncentracije TGF- β 1 i RAGE, kao i koncentracija hsCRP-a značajno povezani sa T1DM.

Primenom multivarijantne analize izvršena je korekcija za demografske karakteristike (uzrast, pol i ITM), te za vrednosti laboratorijskih parametara koji su se značajno razlikovali između pacijenata i kontrola (urea, HDL-H, hsCRP). Nakon korekcije za navedene varijable (model 1), veza između ispitivanih markera inflamacije i T1DM je ostala statistički značajna. Međutim, kada su u analizu dodatno uključene i vrednosti za gensku ekspresiju i koncentracije TGF- β 1 i RAGE (model 2), nivo iRNK za RAGE više nije bio statistički značajno povezan sa T1DM, dok su ostali inflamatorni markeri zadržali statističku značajnost (Tabela 59).

Tabela 59. Rezultati binarne logističke regresione analize

Nezavisne promenljive	OR (95%CI)	<i>P</i>	Nagelkerke <i>R</i> ²
hsCRP, mg/L	1,42 (1,08-1,87)	<0,05	0,066
TGF-β1 iRNK	0,35 (0,24-0,50)	<0,001	0,241
TGF-β1, ng/mL	1,04 (1,02-1,06)	<0,001	0,082
RAGE iRNK	0,41 (0,29-0,59)	<0,001	0,178
sRAGE, ng/mL	3,97 (2,18-7,24)	<0,001	0,140
Model 1	Korigovani OR (95%CI)	<i>P</i>	Nagelkerke <i>R</i> ²
hsCRP, mg/L	1,66 (1,17-2,34)	<0,01	0,321
TGF-β1 iRNK	0,23 (0,14-0,39)	<0,001	0,519
TGF-β1, ng/mL	1,04 (1,01-1,06)	<0,01	0,357
RAGE iRNK	0,32 (0,20- 0,52)	<0,001	0,457
sRAGE, ng/mL	4,35 (2,09- 8,66)	<0,001	0,429
Model 2	Korigovani OR (95%CI)	<i>P</i>	Nagelkerke <i>R</i> ²
hsCRP, mg/L	1,89 (1,21-2,96)	<0,01	
TGF-β1 iRNK	0,15 (0,06-0,39)	<0,001	
TGF-β1, ng/mL	1,07 (1,03-1,12)	<0,001	0,60
RAGE iRNK	1,08 (0,49-2,40)	0,841	
sRAGE, ng/mL	2,51 (1,11-5,71)	<0,05	

U modelu 1 je izvršena korekcija za: pol (0-ženski; 1-muški), uzrast, ITM, ureu, HDL-H i hsCRP.

U modelu 2 je izvršena korekcija za: pol (0-ženski; 1-muški), uzrast, ITM, ureu, HDL-H i hsCRP i koncentracije i nivoe iRNK TGF-β1 i RAGE.

5. Diskusija

T1DM je autoimunska, hronična bolest sa globalno rastućom incidencom (1). Prema studiji koja je obuhvatila 15 regionalnih zdravstvenih centara u Srbiji, desetogodišnja, prosečna standardizovana incidenca T1DM klasifikuje Srbiju u zemlje sa visokom incidencom ove bolesti (5). Epidemiološke studije pokazuju da je povećanje incidence T1DM u poslednjoj deceniji najveće u zemljama u razvoju i ekonomskoj tranziciji (1,4,8), što je u saglasnosti sa istraživanjima sprovedenim u Srbiji i zemljama u okruženju (5). Za razumevanje etiološke osnove bolesti, važno je zapažanje da je najveći porast incidence zabeležen upravo u regionima sa niskom ili umerenom HLA genetskom predispozicijom, ukazujući na rastući uticaj faktora sredine na razvoj bolesti (272). Rezultati epidemioloških studija širom sveta pokazuju da je ateroskleroza, kao dugoročna makrovaskularna komplikacija T1DM, glavni uzrok kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta kod obolelih (64).

Ateroskleroza je potvrđena u brojnim istraživanjima T1DM, ukazujući da nastaje još u ranom detinjstvu i da ima ubrzan i ekstenzivan razvoj (65,66,73). Tradicionalni faktori rizika za KVB, identifikovani još u detinjstvu, uz faktore rizika karakteristične za T1DM, doprinose preuranjenom nastanku i progrediranju KVB u kasnijem životnom dobu. Ozbiljnost aterosklerotskih bolesti u T1DM se vezuje ne samo za postojanje faktora rizika i njihovu interakciju, već i za njihovo dugogodišnje perzistiranje kod obolelih. Zbog svega navedenog, T1DM se smatra nezavisnim faktorom rizika za razvoj KVB (65,66,79). U skladu sa tim su i procene da je rizik od fatalnih ishoda KVB pre četrdesete godine, 20 puta veći kod osoba sa T1DM u odnosu na zdravu populaciju (73). Pored naprednih tehnika za detekciju znaka subkliničke ateroskleroze, poput cIMT i aIMT, kalcifikacije arterija i funkcionalnih abnormalnosti srca, neophodna su dodatna laboratorijska istraživanja ranih aterosklerotskih markera koja obuhvataju pedijatrijsku populaciju. Longitudinalna studija DCCT/EDIC, je pokazala da je HbA_{1c} najsnažniji prediktor KVB u grupi dijabetičara kod kojih na početku studije nije detektovana hipertenzija i hiperholesterolemija (273). Rezultati prospektivne EDC studije (eng. *Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications*) kod pacijenata slične starosti, ali sa dužim trajanjem T1DM na kraju studije u odnosu na DCCT, su pokazali da ekskrecija albumina ima jaču prediktivnu vrednost za KVB u odnosu na HbA_{1c} (274). Pored toga, kod pojedinih učesnika EDC studije su bili prisutni faktori rizika poput hiperholesterolemije i hipertenzije. Incidenca KVB (angine pektoris, patološke revaskularizacije, infarkta miokarda, moždanog udara i smrti od KVB), u ovoj studiji je bila u korelaciji sa dužinom trajanja bolesti, ekskrecijom albumina, hipertenzijom, kao i sa koncentracijama LDL-H, TG i HbA_{1c} (274). Poređenje nalaza ove dve opsežne studije je pokazalo da tradicionalni faktori rizika na sličan način utiču na pojavu kardiovaskularnih komplikacija, ali da prediktivna vrednost metaboličke kontrole i mikroalbuminurije varira u zavisnosti od trajanja T1DM, tj. veća je prediktivna vrednost mikroalbuminurije u slučaju dužeg trajanja bolesti (275). *Bogalusa Hearth* studija je u cilju evaluacije faktora rizika kod zdrave dece i adolescenata utvrdila povezanost ITM, sistolnog i dijastolnog pritiska i dislipidemije sa prisustvom masnih lezija i fibroznih plakova na aorti (276). Faktori rizika za KVB kod dece i adolescenata sa T1DM su evaluirani i u opsežnim studijama preseka, u cilju kontrole promenljivih faktora, te prevencije ili usporavanja ateroskleroze. U multicentričnoj studiji (DPV), koja je sprovedena u Nemačkoj (eng. *The German diabetes documentation and quality management system*), Schwab i saradnici su na uzorku od 33488 ispitanika sa T1DM, mlađih od 18 godina, pokazali da su najučestaliji faktori rizika neadekvatna metabolička kontrola, zatim hipertenzija, dislipidemija, pušenje i gojaznost (72). Istraživanje faktora rizika u okviru NCDQ projekta (eng. *Norwegian Childhood Diabetes and Quality project*) je pored tradicionalnih faktora rizika obuhvatilo i genetsku predispoziciju za pojavu dijabetesa i KVB, kao i bihevioralne karakteristike dece i adolescenata uključenih u studiju. Prikazani rezultati su izdvojili neadekvatnu metaboličku kontrolu u kombinaciji sa genetskim nasleđem i dislipidemijom kao najfrekventnije faktore kardiovaskularnog rizika (73).

Ovo istraživanje je dizajnirano kao studija preseka, a obuhvatilo je pacijente bez prisutnih komplikacija dijabetesa. Demografski podaci ukazuju da nije bilo razlike između grupe dece sa T1DM i KG (Tabela 1), uzimajući u obzir tradicionalne faktore rizika za KVB, kao što su vrednosti sistolnog i dijastolnog pritiska i gojaznost. Gojaznost je detektovana kod 3,5% pacijenata što je manja učestalost u odnosu na rezultate evropskih studija (72,277). Mikroalbuminurija nije zabeležena (Tabela 3), ali pojava ranog povećanja brzine ekskrecije albumina, utvrđena kod približno 19% pacijenata (Tabela 3), ukazuje na potencijalni rizik za KVB (235). U grupi dece sa T1DM je prosečna dužina trajanja bolesti bila duža od pet godina (Tabela 2). Većina pacijenata je dobijala intenzivnu insulinsku terapiju putem multiplih dnevnih injekcija ($\approx 95\%$), dok je malom broju bila dostupna kontinuirana subkutana insulinska infuzija, tj. portabilna insulinska pumpa (Tabela 2). Kod većine pacijenata koji su koristili insulinske analoge se doza insulina izračunavala na osnovu insulinsko-ugljenohidratnog odnosa i faktora osetljivosti. Srednja vrednost HbA_{1c} 7,7% (Tabela 3) i 42% ispitanika sa optimalnom metaboličkom kontrolom u grupi pacijenata, ukazuje na uspešnu metaboličku kontrolu, što se potvrđuje odsustvom komplikacija koje prate dijabetes. DCCT studija je utvrdila prednost intenzivne u odnosu na konvencionalnu insulinsku terapiju kod adolescenata i odraslih osoba sa T1DM u postizanju bolje metaboličke kontrole (75,278). Kao posledica toga, uočena je smanjena incidenca dijabetesnih komplikacija (retinopatije, nefropatije, neuropatije), kao i smanjenje znaka subkliničke ateroskleroze, cIMT i arterijske kalcifikacije. Takođe, procenjeno je da su značajno smanjeni fatalni i nefatalni ishodi KVB u T1DM (60). SEARCH studija (eng. *SEARCH for Diabetes in Youth*) je potvrdila prednost intenzivne u odnosu na konvencionalnu terapiju i kod pedijatrijskih pacijenata u cilju postizanja bolje metaboličke kontrole (279).

Procena lipidnog statusa kod dece sa T1DM u našoj studiji je ispitivana evaluacijom standardnog lipidnog profila i veličine i raspodele lipoproteinskih subfrakcija. U skladu sa rezultatima velikog broja istraživanja, ni u ovoj studiji nije bilo razlike u koncentracijama ukupnog holesterola, LDL-H, non-HDL-H i TG između pacijenata i kontrola (Tabela 4), dok su koncentracije HDL-H u grupi dijabetičara bile značajno više nego u KG (72,83,277,280). Paradoksalna razlika u koncentraciji HDL-H kod pacijenata i zdravih ispitanika potiče, najverovatnije, od efekata insulinske terapije pacijenata. Intenzivni, subkutani režim administracije insulina dovodi do periferne hiperinsulinemije, što indukuje aktivnost lipoproteinske lipaze i dovodi do brze hidrolize TRL. Pored toga, nađeno je da je povećan odnos između lipoproteinske lipaze i hepatične lipaze, tj. povećana aktivnost lipoproteinske lipaze i normalna aktivnost hepatične lipaze, u pozitivnoj korelaciji sa HDL subfrakcijama koje sadrže samo apoA1 (LpA-1) čestice, što uslovljava porast koncentracije HDL-H (281). U studiji Hayashibe i saradnika kod pedijatrijskih pacijenata sa T1DM, dokazano je da periferna hiperinsulinemija dovodi do suprimiranja aktivnosti CETP, što rezultuje povećanjem koncentracije HDL-H (282).

Snižene koncentracije HDL-H ($<0,9$ mmol/L prema preporukama Vodiča za dijagnostikovanje i lečenje lipidskih poremećaja i NCEP III (eng. *National Cholesterol Education Program*) za zdravu decu i prema preporukama Američke asocijacije za dijabetes (ADA, eng. *American diabetes association*) imalo je 3,5% ispitanika u KG i 2% ispitanika u grupi dece sa T1DM (266,283,284). Druge studije su pokazale heterogene rezultate. U DPV studiji koncentracije HDL-H niže od 0,9 mmol/L, je imalo 8% dijabetičara (72). U longitudinalnim studijama koje su sprovedene kod dece i adolescenata sa dijabetesom u Velikoj Britaniji (277) i SAD (280), 6,1 %, odnosno 3,3% ispitanika, je bar jednom u toku ispitivanja imalo HDL-H $<0,9$ mmol/L. SEARCH studija je prikazala manji procenat dijabetičara sa HDL-H $<0,9$ mmol/L u odnosu na zdrave, nezavisno od postignute metaboličke kontrole, što je u saglasnosti sa našim rezultatima (83). U našem istraživanju, koncentracije HDL-H niže od preporučenih za T1DM imalo je 10,6% pacijenata, što je bila značajno viša učestalost nego u KG. Dalje, nismo detektovali značajnu razliku u koncentracijama LDL-H i TG između pacijenata i kontrola (Tabela 4), te je kod 7,9% ispitanika u KG i kod 5,5% pacijenata koncentracija LDL-H bila veća od 3,36 mmol/L, tj. iznad rizične vrednosti za zdravu populaciju (266). Rezultati drugih studija, kao DPV studija i studija sprovedena u Velikoj Britaniji, su pokazali da je oko 10% pacijenata imalo vrednosti LDL-H veće od 3,34 mmol/L (72,277). Izostanak značajnih

razlika između LDL-H kod pacijenata i KG se može objasniti, efektom intenzivne subkutane insulinske terapije. Ovaj način administracije insulina povećava katabolizam apoB100 poreklom iz LDL i pozitivno reguliše ekspresiju i aktivnost LDLR, čime se ubrzava klirens LDL čestica (285).

Međutim, prema preporukama ISPAD i ADA, vrednosti LDL-H za decu sa T1DM > 2,6 mmol/L se definišu kao rizične i zahtevaju korekciju ishrane, životnog stila i metaboličke kontrole, a preporučena je i terapija statinima, kod dece starije od 10 godina, ukoliko koncentracije LDL-H ostanu veće od 3,34 mmol/L. U našoj studiji, kod 23,2% pacijenata koncentracija LDL-H je bila viša od preporučenih vrednosti za T1DM (>2,6 mmol/L) (2,48,284). U studiji preseka sprovedenoj u Norveškoj (NCDQ), koncentracije LDL-H više od preporučenih, imalo je 34,5% pacijenata (73), a u longitudinalnoj studiji koja je sprovedena u Velikoj Britaniji, prekoračenje preporučene vrednosti bar jednom u toku perioda praćenja je zabeleženo kod 37,3% ispitanika (277). U skladu sa prethodno navedenim rezultatima, u našoj grupi ispitanika sa T1DM je utvrđena značajno viša učestalost dislipidemija nego u KG.

Uredan standardni lipidni profil kod osoba sa T1DM ne isključuje mogućnost promene u distribuciji lipoproteinskih subfrakcija u pravcu proaterogenog fenotipa. Zbog toga se uticaj lipoproteinskih subfrakcija na kardiovaskularni rizik procenjuje na osnovu njihove distribucije i veličine, upotrebom metoda ultracentrifugiranja i gradijent-gel elektroforeze, dok se u cilju analize koncentracije čestica unutar svake od subfrakcija koristi NMR spektroskopija. Rezultati studija koje su primenjivale NMR metodu su ukazali na visoku korelaciju sa rezultatima dobijenim metodama ultracentrifugiranja ili gradijent-gel elektroforeze, koje još uvek predstavljaju „zlatni standard“ u analitici lipoproteinskih subfrakcija (286,287), mada se nedovoljna standardizacija metoda primenjenih u studijama javlja kao ključni problem u tumačenju rezultata. Ranija istraživanja su definisala tzv. aterogeni lipoproteinski fenotip, koji se karakteriše dominacijom sdLDL čestica udruženih sa povećanjem koncentracija TG i VLDL čestica i redukcijom velikih HDL čestica, odnosno smanjenom koncentracijom HDL-H (288). Veliki broj studija je ukazao na povezanost kardiovaskularnog rizika i cerebrovaskularnih bolesti sa povećanim udelom ili koncentracijom sdLDL (97). Dokazana je nezavisna povezanost sdLDL kod zdrave populacije sa ranim znacima subkliničke ateroskleroze kao što je cIMT, kao i sa ekspresijom proinflamatornih medijatora u makrofagama (289). Novija istraživanja u okviru ARIC (eng. *The Atherosclerosis Risk in Communities*) studije, koja je uključila više od 11000 ispitanika, pokazala su direktnu korelaciju između koncentracije sdLDL holesterola i rizika za razvoj koronarne bolesti srca, čak i kod ispitanika koji su imali preporučene koncentracije LDL-H. (290). S druge strane, opsežna longitudinalna studija koja je obuhvatila približno 30 000 zdravih žena, od kojih je oko 1000 razvilo KVB tokom 11 godina praćenja, pokazala je da su koncentracije i malih i velikih LDL čestica značajno povezane sa razvojem KVB (291). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima studije MESA (eng. *Multi Ethnic Study of Atherosclerosis*) koja je ispitivala patogenezu i progresiju ateroskleroze kod odraslih osoba bez KVB, evaluacijom lipoproteinskih subfrakcija primenom NMR metode (292). U pomenutoj studiji i male i velike LDL subfrakcije su bile u značajnoj, asocijaciji sa IMT, nezavisno od drugih tradicionalnih faktora rizika, čak i od prisustva dijabetesa. Potencijalni uzrok ovakvih nalaza su mehanizmi koji leže u osnovi proaterogenog efekta lipoproteinskih čestica ekstremnih veličina, jer obe subfrakcije karakteriše smanjeni afinitet ka LDLR (87). Treba istaći da su sprovedena i istraživanja koja nisu pokazala poseban doprinos određivanja LDL subfrakcija u predviđanju kardiovaskularnog rizika, u poređenju sa standardnim lipidnim profilom (291,293).

Podaci o raspodeli i veličini lipoproteinskih subfrakcija kod pacijenata sa T1DM su malobrojni, posebno u pedijatrijskoj populaciji. EDC studija nije potvrdila u NMR analizi prediktivnu vrednost malih i srednjih LDL subfrakcija za KVB kod pacijenata sa T1DM, kao ni značajnu povezanost LDL-H sa KVB tokom istraživanja (287). S druge strane, sve tri klase VLDL čestica, kao i koncentracije TG su pokazale povezanost sa koronarnim bolestima. Iako je povećanje koncentracije TG udruženo sa drugim proaterogenim i protrombotskim promenama, kao i povećanjem koncentracije sdLDL i sniženjem HDL-H, rezultati ove studije ukazuju na primarni aterogeni značaj VLDL čestica u T1DM (287). Studija SEARCH je ukazala na viši udeo sdLDL kod dece sa

dijabetesom, bez obzira na uredan standardni lipidni profil (83). Alabakovska i saradnici su prikazali značajno veću prevalencu sdLDL kod dece sa T1DM (86%) u odnosu na KG (11%), nezavisno od drugih komponenti lipidnog profila i metaboličke kontrole (294).

Suprotno, rezultati našeg istraživanja pokazuju da je udeo sdLDL kod pacijenata bio značajno niži, a udeo većih LDL I i LDL II subfrakcija značajno viši u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 5). Slične podatke su objavili Gallo i saradnici, poredeći marker subkliničke ateroskleroze - arterijsku krutost i veličinu i koncentraciju lipoproteinskih subfrakcija (295). Kod dece sa T1DM su zabeležene značajno niže koncentracije sdLDL u odnosu na kontrolnu grupu. Veće LDL čestice su bile zastupljenije kod dijabetičara, a korelacija između veličine ili koncentracije čestica i arterijske krutosti nije bila statistički značajna (295). Novija ispitivanja lipoproteinskih subfrakcija, NMR tehnikom kod dece i mladih sa T1DM, su demonstrirala veću ukupnu koncentraciju LDL čestica u odnosu na zdrave, ali nisu utvrdila značajne razlike u koncentraciji sdLDL čestica (296). Pored toga, u pomenutoj studiji koncentracija sdLDL je bila u pozitivnoj korelaciji sa cIMT i kod osoba sa T1DM i kod zdravih (296).

Treba napomenuti da je povećanje udela sdLDL čestica nađeno u mnogim stanjima koja su udružena sa razvojem ateroskleroze u detinjstvu i adolescenciji, u koja spadaju gojaznost, insulinska rezistencija, metabolički sindrom i T2DM (297,298). Međutim, pokazano je da su i umerene hiperglikemijske epizode kod dece i adolescenata sa T1DM udružene sa promenama lipoproteinskog profila u smeru manjih i gušćih subfrakcija (83), tako da je pogoršanje glikemijske kontrole praćeno većom koncentracijom sdLDL (286). Novija istraživanja ističu da razlike u proteomu velikih i malih LDL čestica utiču na njihova aterogena svojstva. Nađeno je da sdLDL kod dijabetičara imaju veću količinu apo CIII u poređenju sa većim LDL subfrakcijama (299). Sporiji katabolizam sdLDL u odnosu na veće LDL čestice je uslovljen konformacionim promenama u apoB na površini sdLDL, čime se smanjuje afinitet za LDLR što je uzrok njihovog dužeg zadržavanja u plazmi, posttranslacionih modifikacija, oksidacije i povećanog preuzimanja u subendotelni sloj arterija (300). Treba istaći da su rezultati nedavno objavljene GWAS studije identifikovali značajnu povezanost sdLDL sa genetskim varijantama na 14 različitih gena, od kojih je većina povezana sa kardiovaskularnim rizikom (290).

Kao što je ranije istaknuto, centralna antiaterogena funkcija HDL čestica ostvaruje se u procesu reverznog transporta holesterola. Inicijalno preuzimanje holesterola iz ćelija odvija se preko specifičnih mehanizama efluksa, posredstvom transmembranskih receptora, ATP-vezujućih proteina ABCA1 i ABCG1, kao i putem *scavenger* receptora SRB1. Efluks holesterola se, u humanim makrofagama najvećim delom obavlja preko ABCA1 receptora (301). Glavni akceptori holesterola putem ABCA1 su nascentne HDL čestice (sadrže ApoA1 i malu količinu lipida) i male HDL 3 subfrakcije. Ove čestice takođe imaju i snažnija antioksidativna i antiinflamatorna svojstva (302). Laboratorijsko ispitivanje funkcije HDL čestica u reverznom transportu holesterola kod dece i adolescenata sa T1DM su sprovedi Heier i saradnici u petogodišnjoj longitudinalnoj studiji (303). Studija je pokazala redukovanu HDL funkcionalnost u procesu reverznog transporta holesterola kod pacijenata sa T1DM u odnosu na zdravu decu. Pored toga, pokazano je da se disfunkcija HDL javila neposredno posle nastanka T1DM i perzistirala tokom perioda praćenja (303). Najnovija ispitivanja efikasnosti efluksa holesterola (CEC, eng. *cholesterol efflux capacity*) kod mladih sa T1DM su pokazala da je kapacitet efluksa holesterola u pozitivnoj korelaciji sa udelom velikih HDL čestica i u negativnoj korelaciji sa malim HDL česticama, nezavisno od pola, uzrasta, etničke pripadnosti, udela HbA_{1c}, koncentracije hsCRP i ukupne koncentracije HDL čestica, dok takva korelacija nije potvrđena kod zdravih osoba (296). Pokušaji da se povežu veličina i funkcija, kao i da se identifikuju HDL subfrakcije sa najizraženijim kardioprotektivnim osobinama, su i dalje aktuelne oblasti u istraživanjima, posebno u oboljenjima koja su povezana sa KVB, kao što je T1DM. Analiza HDL proteoma i lipidoma ukazala je na povezanost strukture i funkcije ovog lipoproteina koje utiču na ateroprotektivne sposobnosti u fiziološkim i patofiziološkim stanjima organizma. Pokazano je da strukturne promene unutar HDL čestice uslovljavaju veliku varijabilnost u funkciji HDL i dovode do stvaranja disfunkcionalnih HDL čestica, tj. smanjenja antiaterogenih, a ispoljavanja proaterogenih

svojestava (100, 304). Najznačajniji faktori koji utiču na stvaranje disfunkcionalnih HDL čestica su hiperglikemija, dislipidemija, inflamacija i oksidativni stres (305). Treba pomenuti i činjenicu da metode za analiziranje veličine i distribucije HDL čestica u plazmi nisu standardizovane u dovoljnoj meri da bi se postigao konsenzus u proceni prediktivne vrednosti različitih HDL subfrakcija. Brojne studije u kojima su HDL subfrakcije razdvajane elektroforezom su pokazale recipročni odnos relativnih udela velikih HDL čestica, odnosno direktnu povezanost udela malih HDL čestica sa rizikom za razvoj KVB i cerebrovaskularnih bolesti (97,303,306). U saglasnosti sa prethodnim, i analize NMR metodom pokazuju inverzni odnos koncentracije velikih HDL subfrakcija i kardiovaskularnog rizika, praćen pozitivnom korelacijom malih HDL čestica sa kardiovaskularnim rizikom (307,308). Međutim, u pojedinim istraživanjima, u prisustvu drugih lipidnih i nelipidnih činilaca ova korelacija gubi značajnost, što komplikuje tumačenje kardioprotektivne uloge HDL subfrakcija (291,292).

Kod ispitanika sa dijabetesom u našoj studiji su nađeni značajno veći udeli malih HDL čestica u odnosu na KG, odnosno raspodela HDL subfrakcija je bila pomerena prema manjim HDL 3a, HDL 3b, HDL 3c česticama, uz sniženje udela velikih HDL 2b subfrakcija (Tabela 6). Druga istraživanja koja su obuhvatila populaciju pacijenata sa T1DM sličnog uzrasta su dala heterogene rezultate. NMR lipoproteinski profil dece i mladih sa T1DM se karakteriše većom koncentracijom malih HDL čestica, ali bez razlike u broju ukupnih i velikih HDL čestica u odnosu na zdrave ispitanike (296). Gallo i saradnici su određivali veličinu lipoproteinskih čestica NMR metodom kod dece sa T1DM kod kojih su našli značajno veće koncentracije velikih HDL čestica u odnosu na zdrave ispitanike, suprotno našim rezultatima (295). Autori nisu našli korelaciju između bilo koje komponente lipidnog profila i arterijske krutosti kod dijabetičara, ali je korelacija potvrđena kod ispitanika kontrolne grupe, izводеći zaključak da postoje i drugi faktori koji utiču na pojavu subkliničke ateroskleroze kod T1DM u pedijatrijskoj populaciji (295). EDC studija je utvrdila manje koncentracije velikih HDL čestica kod odraslih pacijenata sa T1DM koji su razvili KVB u odnosu na one koji nisu, ali ne i razliku u koncentraciji malih HDL čestica (287).

U daljoj analizi ispitivali smo uticaj metaboličke kontrole dijabetesa na lipidni status i profil lipoproteinskih subfrakcija. Neadekvatna metabolička kontrola je važan faktor rizika, koji je udružen sa dislipidemijom u T1DM, te je uzročno-posledično povezana sa razvojem ateroskleroze u detinjstvu i KVB u kasnijem životnom dobu (73,279,309). Na osnovu postignute metaboličke kontrole naše pacijente sa T1DM smo podelili u grupe sa dobrom, suboptimalnom i lošom metaboličkom kontrolom. Utvrdili smo značajan porast koncentracija ukupnog holesterola, LDL-H i TG sa pogoršanjem metaboličke kontrole, dok se koncentracije HDL-H u tri ispitivane grupe nisu značajno razlikovale (Tabela 32). Longitudinalna studija SEARCH, koja je pratila odnos HbA_{1c} i lipidnog profila kod dece i adolescenata sa T1DM tokom 2 godine, pokazala je da poboljšanje metaboličke kontrole ima povoljan efekat na ukupni holesterol, LDL-H i non-HDL-H. Izostanak korelacije između HbA_{1c} i HDL-H je uočen i u studiji sprovedenoj u Velikoj Britaniji koja je obuhvatila pedijatrijske pacijente sa T1DM (277). Kod odraslih pacijenata u okviru DCCT studije intenzivni insulinski režim je rezultovao nižim vrednostima HbA_{1c} i HDL-H, ali uz povećanje ITM, te je istaknut potencijalni uticaj insulinske rezistencije na vezu između metaboličke kontrole i koncentracije HDL-H (310). Uočeno je i da je sniženje HbA_{1c} tokom 2 godine praćenja dalo veći efekat na poboljšanje lipidnog statusa kod pacijenata sa većom inicijalnom vrednošću HbA_{1c}, nego kod onih koji su na početku studije imali niže nivoe HbA_{1c}. Generalno, pogoršanje metaboličke kontrole je pokazalo veći efekat na lipidni status nego poboljšanje metaboličke kontrole (309).

U našoj studiji je uočena preraspodela LDL čestica prema manjim dijametrima sa povećanjem udela HbA_{1c} u ispitivanim grupama, kao i porast relativnog udela sdLDL čestica. Udeli najvećih LDL I subfrakcija su bili statistički značajno manji kod pacijenata sa lošom metaboličkom kontrolom u odnosu na pacijente sa suboptimalnom kontrolom, dok razlika u odnosu na grupu sa optimalnom kontrolom nije bila značajna (Tabela 33). Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koji su objavljeni u okviru SEARCH studije gde je kod dece i adolescenata sa T1DM zabeležen porast koncentracije sdLDL sa pogoršanjem metaboličke kontrole (83). Zhang i saradnici su u okviru

DCCT/EDIC studije prikazali značajnu razliku u postignutoj metaboličkoj kontroli između pacijenata na konvencionalnom i intenzivnom insulinskom režimu, koja je uslovlila razliku u raspodeli lipoproteinskih subfrakcija. Intenzivna insulinska terapija je bila udružena sa boljom metaboličkom kontrolom i značajno nižom koncentracijom malih LDL čestica i malih HDL čestica (286). Ovi rezultati su u skladu sa našim rezultatima gde je u grupi sa lošom metaboličkom kontrolom utvrđen najmanji dijametar HDL čestica i najveći udeo malih HDL 3c subfrakcija (Tabela 34).

Okosnicu ovog dela istraživanja predstavlja PCSK9, ključni protein u regulaciji LDLR i koncentracije LDL-H, koji učestvuje i u drugim procesima vezanim za homeostazu lipida i glukoze, te može imati ulogu u razvoju ateroskleroze u T1DM. Levenson i autori su prikazali značajno povišene koncentracije PCSK9 kod dece i adolescenata sa T1DM u odnosu na zdravu decu, za razliku od nas (179). U našoj studiji nije pokazana statistički značajna razlika u koncentracijama PCSK9 u plazmi pacijenata sa T1DM i ispitanika u KG (Slika 12), kao ni korelacija koncentracije ovog proteina sa demografskim karakteristikama u obe grupe ispitanika (Tabela 10). Treba istaći da su koncentracije PCSK9 u krvi podložne velikoj intra- i interindividualnoj varijaciji, usled cirkadijalnog ritma, načina ishrane i uticaja uzrasta, pola i pubertetskog stadijuma (141,311). Ranije je objašnjeno da insulin značajno utiče na sintezu PCSK9 u jetri i njegovu koncentraciju u cirkulaciji (159,163). Kod obolelih od T1DM ne postoji endogena portalna stimulacija lučenja insulina, već se on administrira subkutano, te se može očekivati nishodna regulacija PCSK9 ekspresije u jetri, a posledično i niže koncentracije PCSK9 u serumu. To može biti dodatni razlog zbog koga u našoj studiji nisu utvrđene razlike u koncentracijama PCSK9 između pacijenata sa T1DM i ispitanika KG.

Povezanost PCSK9 sa parametrima metaboličke kontrole je jasno pokazana u našoj studiji. Kod ispitanika sa T1DM smo pokazali da koncentracija PCSK9 značajno raste sa porastom HbA_{1c} i prosečnom koncentracijom glukoze, za razliku od kontrolne grupe, gde ova veza nije utvrđena (Tabela 11). Pored ovoga, pokazana je značajna korelacija između koncentracija PCSK9 i koncentracije lipidnih parametara (ukupnog holesterola, LDL-H, TG i non-HDL-H) kod pacijenata, što nije uočeno u grupi zdravih ispitanika (Tabela 12). Baass i saradnici su prikazali direktnu korelaciju između koncentracije PCSK9 i ukupnog holesterola, LDL-H i TG, ali i između HDL-H i apoA1 kod zdrave dece (141), što se razlikuje od naših rezultata. Broj i različita raspodela ispitanika po pubertetskom stadijumu i polu u našoj studiji se znatno razlikuje od pomenute, opsežne, populacione studije, što je potencijalni uzrok razlike u rezultatima. Korelacija između nivoa PCSK9 i HDL-H u našoj studiji nije potvrđena ni kod ispitanika sa T1DM, niti kod zdrave dece. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima Laugier-Robiolle i saradnika koji u grupi odraslih pacijenata sa T1DM nisu našli značajnu korelaciju PCSK9 i HDL-H, ali su zabeležili pozitivnu korelaciju sa drugim lipidnim parametrima: LDL-H, trigliceridima i ApoB (143). Pozitivna korelacija između PCSK9 i LDL-H je konzistentna sa rezultatima istraživanja sprovedenih u populacijama pacijenata sa dijabetesom (143,312), dok je u većini izostala korelacija sa HDL-H (143, 168).

S obzirom na malobrojnost istraživanja PCSK9 koja uključuju pacijente sa T1DM, treba istaći da su novija istraživanja pokazala direktnu povezanost koncentracije PCSK9 sa proaterogenim lipidnim statusom kod pacijenata sa već postojećim KVB, kao i prediktivnu vrednost ovog parametra za procenu rizika za razvoj KVB (151,313-315). Leander i saradnici su pokazali da koncentracija PCSK9 ima prediktivni značaj za razvoj KVB u budućnosti, nezavisno od drugih faktora rizika (316). Nozue i saradnici su kod odraslih pacijenata sa anginom pectoris prikazali direktnu korelaciju nivoa PCSK9 sa sdLDL, oksidovanim LDL i Lp(a) (314). Pozitivnu korelaciju između PCSK9 i sdLDL su našli i Zhang i saradnici kod pacijenata sa ustanovljenim KVB, ali ne i kod kontrola, slično kao i Kwakernaak i saradnici koji nisu potvrdili povezanost između PCSK9 sa sdLDL kod zdravih osoba. (151,315). Veza između PCSK9 i oksidovanog LDL je potvrđena i u drugim studijama (317).

Daljom evaluacijom dislipidemije u dijabetesu smo analizirali povezanost PCSK9 sa veličinom i raspodelom LDL i HDL subfrakcija. U skladu sa tim je utvrđena pozitivna korelacija PCSK9 sa veličinom LDL čestica i negativna korelacija sa relativnim udelom malih LDL subfrakcija (Tabela 13), kao i negativna korelacija sa dijametrom HDL, a pozitivna korelacija sa udelom malih

HDL 3a čestica u grupi dece sa T1DM (Tabela 14). Ovakav nalaz nije u saglasnosti sa ranije pomenutim istraživanjima koja su obuhvatila osobe sa već ustanovljenim KVB, a naša studija je prvo istraživanje koje je urađeno kod pedijatrijskih pacijenata sa T1DM. U kontrolnoj grupi nije bilo korelacije PCSK9 sa veličinom i raspodelom lipoproteinskih subfrakcija (Tabele 13 i 14). Poređenjem raspodele LDL i HDL subfrakcija u odnosu na graničnu koncentraciju LDL-H, utvrdili smo da su kod dece sa T1DM sa koncentracijama LDL-H iznad 2,6 mmol/L značajno veće koncentracije PCSK9 i u skladu sa tim značajno veći relativni udeli sdLDL, a značajno manji LDL dijometri. Proaterogeni profil lipoproteinskih čestica se manifestovao i smanjenjem udela velikih HDL 2b subfrakcija (Tabela 37). Međutim, naši rezultati su pokazali negativnu korelaciju koncentracije PCSK9 sa udelom sdLDL čestica u grupi dijabetičara sa optimalnom koncentracijom LDL-H (Tabela 38). Za potencijalno objašnjenje navedenih rezultata bi se mogli iskoristiti rezultati II faze randomizovanog, placebo-kontrolisanog ispitivanja primene inhibitora PCSK9 alirokumaba. Ova klinička studija je pokazala da se redukcija koncentracije LDL-H, kao posledice inhibicije PCSK9, povoljno odrazila na sve LDL subfrakcije, ali je najmanji efekat ostvaren na udeo sdLDL, verovatno zbog manjeg afiniteta sdLDL prema LDLR u odnosu na velike LDL subfrakcije (318).

Rezultati naše studije pokazuju uticaj parametara metaboličke kontrole na odnos nivoa PCSK9 i lipoproteinskih subfrakcija kod dijabetičara. Pacijenti sa dobrom glukoregulacijom su imali značajno niže koncentracije PCSK9 (Slika 17). Nismo našli razliku u koncentracijama PCSK9 između dečaka i devojčica sa T1DM, kao ni razliku drugih parametara, izuzev veće koncentracije glukoze kod dečaka sa lošom glikemijskom kontrolom u odnosu na devojčice sa istim stepenom postignute metaboličke kontrole (Tabela 35). Levenson i saradnici su u grupi pedijatrijskih pacijenata sa T1DM i u grupi zdravih ispitanika uočili da su koncentracije PCSK9 kod devojčica više nego kod dečaka (179). Njihovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Baass i saradnika koji su objavili razliku u koncentraciji PCSK9 kod zdrave dece u odnosu na uzrast i pol (141). Međutim, daljim poređenjem PCSK9 u grupi sa T1DM prema Tanner-ovom stadijumu puberteta, Levenson i saradnici nisu ustanovili značajne razlike između ispitanika u prepubertetu i pubertetu (179), što nije u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima Ghosh i saradnika o značajnom uticaju nivoa endogenog estrogena na koncentraciju PCSK9 kod žena (319).

Optimalna glikemijska kontrola u T1DM utiče na regulaciju koncentracije LDL-H (85), što smo potvrdili našim rezultatima, gde je 90,8% pacijenata sa optimalnom metaboličkom kontrolom imalo preporučene vrednosti LDL-H. U grupi sa suboptimalnom i lošom glikemijskom kontrolom, 34,1% pacijenata je imalo koncentracije LDL-H više od preporučenih, što je praćeno značajno povišenim koncentracijama PCSK9 (Slika 18). Uticaj loše metaboličke kontrole na odnos PCSK9 i LDL-H su prikazali Laugier-Robbiole i saradnici kod odraslih pacijenata sa T1DM kod kojih je utvrđena pozitivna korelacija ova dva parametra, dok korelacija kod pacijenata sa dobrom metaboličkom kontrolom nije potvrđena (143).

Dislipidemija i povećana degradacija LDLR, posredovana povećanjem PCSK9 nivoa, izaziva akumulaciju sdLDL (151,181). Međutim, u grupi pacijenata sa dobrom metaboličkom kontrolom smo utvrdili negativnu korelaciju PCSK9 sa relativnim udelom sdLDL, dok u grupi sa lošom metaboličkom kontrolom nije bilo statističke značajnosti. Inverzna povezanost između PCSK9 i sdLDL u grupi sa dobrom metaboličkom kontrolom ostala je značajna i u multivarijantnoj analizi (Tabela 36). Moguće objašnjenje se nalazi u fiziološkim karakteristikama same molekule PCSK9. Nedavno je dokazano da se više od 30% molekula PCSK9 u serumu osoba sa normolipidemijom nalazi vezano za Apo B100 na LDL čestici (132,133,135). U kulturi ćelija je pokazano da se vezivanjem PCSK9 za LDL inhibira dejstvo PCSK9, tj. smanjuje se sposobnost njegovog vezivanja za LDLR na površini ćelije, ali je mehanizam ove inhibicije još uvek nerazjašnjen. N-terminalni deo na prodomenu PCSK9 molekule je detektovan kao mesto na kome se ostvaruje veza sa LDL česticom (135), međutim, nije poznato kakvim se afinitetom vezuju različite LDL subfrakcije, uzimajući u obzir njihovu heterogenost u pogledu veličine i gustine. U prilog ovome su rezultati istraživanja koji su pokazala da je PCSK9 u kompleksu sa LDL inaktivirana forma (130). Ovo tumačenje naših rezultata bi se moglo dopuniti zaključcima koje su izneli Glerup i saradnici, da LDL-H (odnosno broj

LDL čestica) reguliše koncentraciju PCSK9 u plazmi (320). U grupi sa optimalnim LDL-H i dobrom glikemijskom kontrolom, izmerene su niže koncentracije PCSK9, što može biti posledica vezivanja ovog proteina za sLDL čestice (Slika 18), te posledično smanjene degradacije LDLR.

Kompleksna regulacija koncentracije i aktivnosti PCSK9 podrazumeva pojačavanje aktivnosti stvaranjem dimera ili trimera i fiziološko smanjenje aktivnosti ovog enzima koje je u cirkulaciji posredovano protein-konvertazama furinom i PC5/6, koje uklanjaju N-terminalni i deo katalitičkog domena neophodnog za vezivanje PCSK9 za LDLR (131,133). Potvrđeno je da 10-20% ukupne količine PCSK9 u cirkulaciji zdravih osoba predstavljaju forme sa smanjenom aktivnošću, nastale pod dejstvom proteaza (130). Ispitivanja koja su imala cilj da utvrde da li proteaznoj aktivnosti furina podleže samo intaktni ili/i oblik enzima koji je vezan za LDL, odnosno koji oblik PCSK9 zadržava aktivnost u plazmi, su pokazala da vezana PCSK9-LDL forma ne podleže enzimskoj degradaciji, za razliku od intaktne PCSK9 molekule. To govori u prilog hipotezi da vezani oblik PCSK9 zadržava biološku aktivnost (134). Međutim, potvrda predloženog mehanizma regulacije aktivnosti PCSK9 zahteva dalja istraživanja. Neophodno je istaći da različite metode koje se koriste za kvantifikaciju PCSK9, u kliničkim studijama i istraživanjima na eksperimentalnim modelima doprinose diskrepanci u rezultatima. Takođe, većina testova koji se koriste u kliničkim studijama ne razlikuju vezane od intaktnih ili furin-degradiranih formi PCSK9. Posebna vrednost studije koju su izveli Nozue i saradnici je korišćenje testova za određivanje koncentracije obe forme PCSK9: heterodimera i skraćene forme pod dejstvom furina, koja je potvrdila smanjeno dejstvo u odnosu na intaktnu formu, odnosno dimer (314). Test koji je korišćen u našoj studiji podrazumeva određivanje koncentracije ukupnog PCSK9, odnosno, intaktne, vezane za LDL i skraćene forme PCSK9 (321). Proaterogeni efekat PCSK9 kod pacijenata sa neadekvatnom metaboličkom kontrolom je potvrđen i negativnom korelacijom koncentracije ovog proteina sa veličinom HDL čestica, tj. pozitivnom korelacijom sa relativnim udelima malih HDL 3c subfrakcija. Povezanost koncentracija PCSK9 sa udelom HDL 3c subfrakcija i koncentracijom TG je bila nezavisna od pola, dnevne doze insulina i koncentracije drugih lipidnih parametara (Tabela 36). Redukovani nivoi HDL-H i dominacija malih HDL subfrakcija sa povećanim sadržajem TG je karakteristika insulinske rezistencije, početnog poremećaja homeostaze glukoze koji može progredira do metaboličkog sindroma i T2DM. Hipertrigliceridemija koja je pratilac insulin-rezistentnih stanja, nastala usled povećane sinteze i smanjenog katabolizma, pre svega, VLDL1 subfrakcija, rezultuje naglašenom aktivnošću CETP, a vodi ka stvaranju malih, HDL subfrakcija. Male, guste HDL čestice se zatim razgrađuju pod dejstvom hepatične lipaze (89), čemu sledi sniženje koncentracije HDL-H. Međutim, insulinska rezistencija u T1DM, najčešće ima drugačiji efekat na standardni lipidni profil i verovatno drugačije mehanizme nastanka. Subkutana primena insulina i izostanak portalne regulacije insulina, kod pacijenata sa T1DM omogućava perzistentno lučenje glukagona, snižava sekreciju IGF-1, što negativnom povratnom spregom povećava sekreciju hormona rasta. Smatra se da poremećena sprega između ovih hormona, podstiče jetru na kontinuirano oslobađanje glukoze, koja doprinosi hiperglikemiji i insulinskoj rezistenciji (322). Ovo je potvrđeno ispitivanjem efekata promene načina administracije insulina kod pacijenata sa T1DM koji su imali dobru metaboličku kontrolu. Naime, nakon prelaska sa intraperitonealne na subkutanu primenu insulina, detektovan je povećan transfer estara holesterola sa HDL na lipoproteinske čestice koje sadrže ApoB i akumulacija malih HDL subfrakcija, što je karakterističan nalaz za insulin-rezistentna stanja (323). Razvoj insulinske rezistencije u T1DM doprinosi većem riziku od mikro- i makrovaskularnih komplikacija, što su pokazali Purnell i saradnici u okviru DCCT studije (310), uvodeći termin „duplog dijabetesa”. Uticaj insulinske rezistencije na lipoproteine je proučavan u malom broju studija, naročito kod dece i adolescenata. Poseban značaj imaju novije studije koje uključuju ispitanike na savremenoj terapiji insulinskim analogima koja obezbeđuje održavanje striktno metaboličke kontrole. Nadau i saradnici su objavili da adolescenti sa T1DM imaju veći stepen insulinske rezistencije u odnosu na zdrave ispitanike sa istim vrednostima ITM. Povećanje insulinske rezistencije nije bilo povezano sa glikemijskom kontrolom, a obe grupe su imale niži stepen insulinske rezistencije u odnosu na vršnjake sa T2DM (96). Fenotip koji karakteriše insulinsku rezistenciju, a uključuje povišene TG, povećan odnos

TG/HDL, nisku koncentraciju HDL-H, visceralnu i opštu gojaznost, inflamaciju niskog stepena i nisku koncentraciju adiponektina, nije dokazan u pomenutoj studiji, iz čega proizilazi zaključak o postojanju jedinstvenog fenotipa za insulinsku rezistenciju u T1DM. Bez obzira na to, kod ispitivane grupe pacijenata sa T1DM ustanovljena je kardiovaskularna disfunkcija, koja se manifestovala smanjenim kapacitetom za aerobne aktivnosti (96). Dalja istraživanja su dokazala da postoji direktna povezanost insulinske rezistencije kod dece sa T1DM i proaterogenog lipidnog profila, koji se ogleda promenama u sastavu i raspodeli lipoproteinskih subfrakcija, konkretno u dominaciji manjih i gušćih čestica (324). Ovi rezultati su u saglasnosti sa ranijim istraživanjima insulinske rezistencije kod odraslih osoba sa T1DM, što ukazuje da poremećaji u metabolizmu lipida udruženi sa insulinskom rezistencijom počinju rano u mladosti (325).

Povezanost PCSK9 i markera insulinske rezistencije u zdravoj pedijatrijskoj populaciji i kod adolescenata sa T2DM su ranije zabeležena (141,142,168). Iz rezultata nekoliko eksperimentalnih i kliničkih ispitivanja u metaboličkom sindromu i T2DM su izvedene 2 hipoteze o vezi između PCSK9 i insulinske rezistencije. Prema jednoj, koncentracije PCSK9 su uslovljene generalnim statusom insulinske rezistencije, dok druga hipoteza tvrdi da PCSK9 može direktno da utiče na metabolizam glukoze (181). U našoj studiji smo postavili hipotezu da se insulinska rezistencija nalazi u osnovi uočene veze između PCSK9 i lipoproteinskih subfrakcija. Tu pretpostavku smo ispitali analizom korelacija koncentracija PCSK9 i udela malih gustih LDL sa eGDR i sa dnevnom dozom insulina, uzimajući u obzir postignutu metaboličku kontrolu. eGDR je model koji se, na osnovu visoke korelacije sa metodom euglikemijskog hiperinsulinemijskog klampa, upotrebljava za procenu insulinske rezistencije kod odraslih i dece sa T1DM (94). Kod naših ispitanika je koncentracija PCSK9 bila u inverznoj korelaciji sa eGDR, nezavisno od metaboličke kontrole, što znači da su pacijenti sa većim stepenom insulinske rezistencije imali više koncentracije PCSK9 (Tabela 39). Za razliku od navedenih studija u pedijatrijskoj populaciji (324), rezultati naše studije nisu doveli u vezu insulinsku rezistenciju sa proaterogenim, malim gustim LDL česticama (Tabela 39).

Autoimunske bolesti udružene sa T1DM, ispoljene u pedijatrijskom uzrastu predstavljaju dodatni rizik za mikro- i makrovaskularne komplikacije (242). Pokazano je da hronična inflamacija, koja je pratilac autoimunskih poremećaja, ima uticaja na progresivni razvoj ateroskleroze (241). Disfunkcija vaskularnog endotela je ključni činilac aterogeneze i počinje pre formiranja aterosklerotske lezije, gde povećano oslobađanje medijatora inflamacije u autoimunskim stanjima značajno doprinosi endotelnom oštećenju (326). S obzirom na visoku prevalencu CB i ATD u T1DM, ispitali smo njihov uticaj na lipidni status i profil lipoproteinskih subfrakcija. Pacijenti su podeljeni u tri grupe; grupu bez pridruženih autoimunskih bolesti, grupu sa ATD i grupu sa CB (Tabela 43). Analizirane grupe se nisu međusobno razlikovale prema demografskim karakteristikama ni prema parametrima metaboličke kontrole (Tabele 43 i 44). Pokazali smo da su frekvence povišenog LDL-H i sniženog HDL-H značajno veće u grupama pacijenata sa i bez koegzistirajuće autoimunske bolesti u odnosu na KG (Slika 19). Ova razlika je u saglasnosti sa drugim istraživanjima koja su obuhvatila i pedijatrijske i odrasle pacijente (249, 254, 327). Daljom evaluacijom lipidnog profila pacijenata, pokazali smo značajno niže koncentracije HDL-H kod pacijenata sa ATD i CB u odnosu na pacijente bez udruženih bolesti (Tabela 46). Detektovali smo i pomeranje raspodele HDL subfrakcija prema malim česticama, pre svega u kod pacijenata sa CB, koji su imali i najnižu koncentraciju HDL-H (Tabele 46 i 48). Pored toga, zabeležili smo značajno manje udele velikih HDL 2 subfrakcija kod dece sa T1DM u odnosu na kontrolnu grupu, posebno kod onih sa CB kod kojih je udeo velikih HDL čestica bio značajno manji u odnosu na druge grupe dece sa T1DM (Slika 21, Tabela 48). Koncentracije LDL-H i dijometri LDL subfrakcija nisu pokazali značajnu razliku između ispitanika sa T1DM i zdravih ispitanika (Slika 20), kao ni između ispitivanih grupa pacijenata u našoj studiji (Tabela 47).

Proaterogeni lipidni profil koji smo prikazali kod pacijenata sa CB je u skladu sa rezultatima drugih studija. Warncke i saradnici su u okviru DPV studije našli značajno niže nivoe HDL-H kod dijabetičara sa udruženom CB u odnosu na one bez CB (254), nezavisno od pola, uzrasta, trajanja dijabetesa, ITM, metaboličke kontrole i doze insulina. Saglasno sa našim rezultatima, nije bilo razlike

u drugim komponentama lipidnog profila. Leeds i saradnici su konstatovali sniženje koncentracije HDL-H i kod dijabetičara sa CB u adultnom uzrastu (327). U obe studije, odnosno i kod dece i odraslih ispitanika, utvrđene su značajno povećane koncentracije HDL-H posle prelaska na ishranu bez glutena (254, 327), nezavisno od postignute metaboličke kontrole ili insulinske terapije (254). Mehanizam kojim bi se objasnio ovaj porast HDL-H nije razjašnjen, ali se pretpostavlja da je u osnovi smanjenje hronične inflamacije uzrokovane normalizacijom intestinalne mukoze (255). U patogenezi CB učestvuju različiti inflamatorni medijatori koji dovode do oštećenja intestinalnog epitela. Peptidi iz glutena izazivaju infiltraciju limfocita u intestinalnoj lamini propriji koji dalje oslobađaju citokine poput IFN- γ , IL-6 i TNF- α . Ovi proinflamatorni citokini propagiraju mobilizaciju i nakupljanje inflamatornih ćelija, makrofaga i fibroblasta, čemu sledi amplifikacija inflamatornog procesa i destrukcija intestinalnog epitela (328). Kod dece sa nekontrolisanom CB je iz krvi izolovana značajno veća koncentracija citokina, IFN- γ , IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-13 u poređenju sa zdravom decom (329), dok je posle perioda pridržavanja dijeta bez glutena, došlo do pada koncentracije IL-10, IL-5 i IL-12p70 (329). Za razliku od prethodno navedenog, u okviru istraživanja koje je uključilo pedijatrijske pacijente sa T1DM, sa i bez CB, je prikazana veća koncentracija TNF- α , IFN- γ i IL-6, ali i niža koncentracija IL-10 kod pacijenata sa udruženom CB. U istoj studiji je utvrđena i korelacija između TNF- α , IFN- γ i IL-6 i anti-tTG IgA i anti-tTG IgG (330).

Eksperimentalne studije su pokazale da postoje zajednički putevi inflamatornog oštećenja endotela krvnih sudova i intestinalnog epitela. U humanoj aorti razvoj aterosklerotskog plaka je praćen pojačanom ekspresijom proinflamatornih citokina, uključujući IFN- γ , TNF- α , IL-1 β i IL-17 (331). Pored toga, eksperimentalno je potvrđeno da je IL-17 spona između aterosklerotskog vaskularnog oštećenja i autoimunske izazvane inflamatorne reakcije (332). Ovo naznačava da bi modulacija inflamatornog procesa usled pridružene autoimunske bolesti, mogla da uspori aterosklerotska oštećenja krvnih sudova u T1DM. U prilog tome govore i prethodno opisani rezultati istraživanja, koja su pokazala da sa smanjenjem stepena inflamacije dolazi i do poboljšanja lipidnog profila. Povećani rizik od rane ateroskleroze kod odraslih pacijenata sa T1DM i pridruženom CB je potvrđen značajno povećanom cIMT u odnosu na pacijente sa celijačnom bolešću, T1DM bez CB i zdrave ispitanike (257). Povećane koncentracije hsCRP su nađene u svim ispitivanim grupama u odnosu na zdrave, uključujući i grupe sa CB, bez obzira na striktno pridržavanje dijeta bez glutena, što potvrđuje da inflamacija stoji u osnovi rane ateroskleroze (257, 241). Novija istraživanja su uočila porast koncentracije PCSK9 kod pacijenata sa subkliničkim hipotireoidizmom (333). U našoj studiji, najviše koncentracije PCSK9 su zabeležene u grupi pacijenata sa pridruženim ATD, ali bez značajne razlike u koncentraciji između ispitivanih grupa (Slika 22).

Dislipidemiju kod pacijenata sa komorbiditetima smo dalje ispitivali poređenjem indeksa ateroskleroze LDL-H/HDL-H, kao surogat markera koji pokazuje odnos proaterogenih i antiaterogenih lipoproteina u serumu. Najviše vrednosti ovog indeksa su zabeležene u grupi pacijenata sa pridruženom CB, i to značajno više u odnosu na pacijente bez pridružene bolesti. Koncentracije triglicerida i antiTPO antitela su bile nezavisni prediktori povišenog indeksa ateroskleroze i ukazale na još jedan aspekt dislipidemije i rizika od ateroskleroze kod dece obolele od T1DM sa komorbiditetima (Tabela 49). Nezavisna povezanost antiTPO antitela i indeksa ateroskleroze je u saglasnosti sa ranijim dokazima o postojanju kardiovaskularnog rizika u slučaju autoimuskog poremećaja tireoidne žlezde, nezavisno od stepena njene disfunkcije (249). U okviru DPV studije, kod dece i adolescenata sa T1DM i subkliničkim autoimuskim tireoiditisom su detektovani povišeni nivoi holesterola i LDL-H u odnosu na ispitanike bez autoimuskog poremećaja tireoidne žlezde (249). Takođe, nedavno je publikovan nalaz povećanog cIMT i koncentracije LDL-H kod grupe eutireoidnih devojčica sa povišenim antiTPO antitelima (334).

Dalja analiza je pokazala da pacijenti sa pridruženim autoimuskim bolestima imaju tri puta veću verovatnoću za snižene koncentracije HDL-H, nezavisno od prisustva tradicionalnih faktora rizika za makrovaskularne komplikacije dijabetesa (Tabela 50). Rezultati naše studije ukazuju na dodatno smanjenu ateroprotektivnu sposobnost HDL čestica kod dijabetičara sa udruženom autoimuskom bolešću u odnosu na pacijente koji nemaju komorbiditet, na više različitih nivoa.

Novija istraživanja su dokazala da je inflamacija kritični parametar u modifikaciji HDL proteoma i lipidoma (110). U inflamatornim stanjima dominantni proteini prisutni u HDL su serumski amiloid A, apoC-IV, apo C-III ili C3 komponente komplementa, ali su smanjene količine apoA1, apoM i apoJ. U inflamaciji se značajno smanjuje funkcionalnost HDL, usled zamene apoA1 serumskim amiloidom A (SAA). Ovaj protein spada u reaktante akutne faze (110), koji promovišu migraciju, adheziju i tkivnu infiltraciju polimorfonuklearnih leukocita. Sve ovo ukazuje da je u inflamaciji značajno snižen antiinflamatorni potencijal HDL čestica. Još jedna od značajnijih promena HDL proteoma u inflamaciji je sniženje aktivnosti PON1. PON1 učestvuje u antioksidativnim i antiinflamatornim funkcijama HDL čestica, pre svega u prevenciji oksidacije LDL, kroz interakciju sa apoA1 i LCAT (335). U našoj studiji smo potvrdili pomeranje raspodele HDL subfrakcija prema malim i gušćim česticama, što se potencijalno odražava na smanjenu efikasnost procesa reverznog transporta holesterola. Pokazano je da SR-B1 receptori na površini hepatocita, koji učestvuju u procesu preuzimanja holesterola u jetri prevashodno vezuju veće HDL čestice (336). Ranije je pomenuto da su SR-B1 receptori eksprimirani i na makrofagama, gde posreduju u procesu efluksa holesterola, tako što primarno vezuju HDL 2 subfrakcije (336).

Treba pomenuti da smo u našem istraživanju uočili vezu između veće brzine urinarne ekskrecije albumina i nižih koncentracija HDL-H kod pacijenata sa komorbiditetima, mada na granici statističke značajnosti (Tabela 50). Prethodnim istraživanjima pedijatrijskih pacijenata sa T1DM i udruženom celijačnom bolešću je pokazano da je rano povećanje ekskrecije albumina bilo povezano sa unosom glutena i nezavisno od metaboličke kontrole, kao i da se ekskrecija smanjivala striktnim pridržavanjem bezglutenske ishrane (256,337). Na osnovu naših rezultata, može se pretpostaviti da prisustvo disfunkcionalnih HDL čestica, udruženo sa smanjenom koncentracijom HDL-H, može ispoljiti nezavisno ili sinergističko dejstvo sa povećanom ekskrecijom albumina u progresiji makrovaskularnih komplikacija T1DM sa udruženim ATD ili CB.

T1DM je autoimunski poremećaj koji se karakteriše destrukcijom β ćelija pankreasa, koja je posredovana dejstvom i interakcijama T ćelija. Aktivacija autoimunskog odgovora započinje aberantnom ćelijskom prezentacijom antigena, čiji je uzrok i dalje nerazjašnjen. Dugi asimptomatski period između pojave autoantitela u cirkulaciji i bolesti se smatra periodom pogodnim za potencijalnu prevenciju ili odlaganje početka bolesti (1). Simptomi T1DM nastaju kada je približno 90% mase β ćelija izgubljeno (338), što ukazuje na značaj otkrivanja promene genske ekspresije markera na pankreasnim β ćelijama i efektorskim ćelijama u cilju praćenja razvoja bolesti, ali podrazumeva invazivno uzorkovanje tkiva. Pokazano je da su imunske efektorske ćelije u infiltratu na pankreasnim ostrvcima zahvaćenih insulitisom u ravnoteži sa cirkulišućim pulom ćelija u perifernoj krvi (339). Pored toga, metabolički poremećaji koji karakterišu dijabetes potencijalno utiču na sve ćelije u organizmu, tako da smo u ovom istraživanju koristili PBMC kao uzorak izbora. Gensku ekspresiju RAGE i TGF- β 1 smo izmerili u PBMC, a koncentracije TGF- β 1 i solubilne izoforme RAGE, u plazmi ispitanika sa T1DM. Iz ovog dela istraživanja smo isključili ispitanike sa ATD ili CB, jer je njihov imunološki profil kompleksniji, zbog učinka pridružene autoimunske bolesti na osnovnu bolest.

U dostupnoj literaturi se može videti da se nivoi iRNK proinflamatornih i regulatornih citokina i njihove koncentracije u krvi obolelih razlikuju u zavisnosti od dužine trajanja dijabetesa i starosti pacijenata (340-343). U našoj studiji su nivoi iRNK TGF- β 1 bili značajno niži kod pacijenata sa T1DM u odnosu na zdrave ispitanike (Slika 14 i Tabele 15 i 16). Poznato je da TGF- β 1 indukuje imunsku toleranciju, delujući inhibitorno na proliferaciju, diferencijaciju, aktivaciju i efektorsku funkciju imunskih ćelija (213). Ovaj citokin može da indukuje diferencijaciju T ćelija u regulatorne ili, u zavisnosti od prisustva drugih citokina, u patogene Th17 ćelije, koje sintetišu IL17 i učestvuju u patogenezi T1DM i drugih sistemskih autoimunskih bolesti (344). Pored toga, regulatorne ćelije centralne tolerancije (tTreg) mogu da sekretuju TGF- β 1 (215), što se smatra njihovom primarnom funkcijom u prevenciji T1DM (345). Balans između Th17 i podtipova Treg se smatra ključnim u održavanju imunske homeostaze, a disbalans između ovih ćelija u smeru proinflamatornih Th17, je potvrđen kod dece sa T1DM (346). Han i saradnici su uočili značajnu nishodnu regulaciju genske

ekspresije regulatornih medijatora TGF- β 1 i Foxp3, ali i proinflammatoryh citokina poput TNF α , IL-6 kod dijabetičara kod kojih bolest traje duže od 5 godina, u odnosu na one kod kojih je bolest tek otkrivena i osoba sa rizikom za razvoj bolesti, kao i u odnosu na zdrave. Nivoi iRNK TGF- β 1 u toj studiji nisu pokazali korelaciju sa postignutom metaboličkom kontrolom, ni sa starošću pacijenata (340). Halminen i saradnici su zabeležili značajno niže nivoe iRNK TGF- β 1 kod dece s novootkrivenim T1DM i dece sa povećanim rizikom (na osnovu prisustva 1 ili više antitela), u odnosu na zdravu decu. Smanjenu ekspresiju TGF- β 1 i IL-4 autori tumače dominantnim delovanjem Th1 limfocita u progrediranju bolesti i posledično, smanjenom kontrolom citotoksičnog autoimunskog odgovora (341). Niži nivoi iRNK TGF- β 1 su detektovani u PBMC kod obolelih od T1DM u studiji koja je poredila ekspresiju ovog citokina kod pacijenata sa T1DM i T2DM i zdravih osoba. Pored ovoga, u T1DM je bila prisutna povećana ekspresija proinflammatoryh citokina IL-23, koji indukuje stvaranje patogenih Th17 ćelija (342). Opsežna studija koja je obuhvatila 922 pacijenta sa T1DM je prikazala profil ekspresiranih gena u PBMC koristeći *microarray* tehnologiju. Analizom 18 gena koji su uključeni u kontrolu inflamacije i imunskog odgovora, nađeno je da osam gena (*TGF- β 1*, *S100A8*, *S100A9*, *MNDA*, *SELL*, *PSMB3*, *CD74*, *IL2A*) ima značajno veću ekspresiju kod pacijenata sa T1DM u odnosu na kontrolnu grupu. U skladu sa rezultatima, autori su ukazali na potencijalnu ulogu TGF- β 1 kao proinflammatoryh citokina u T1DM (343). Poremećaji mehanizama ekspresije i sinteze TGF- β 1, kao i zastupljenost T ćelija u PBMC pulu je u skladu sa stadijumom dijabetesa ispitanika, te je verovatno uzrok kontradiktornih rezultata studija koje su ispitivale gensku ekspresiju ovog citokina.

Kempf i saradnici su utvrdili sniženu ekspresiju TGF- β 1 u pulu cirkulišućih leukocita kod pacijenata sa akutnim infarktom miokarda (347). Suprotno ekspresiji, koncentracije TGF- β 1 u plazmi su bile značajno više kod pacijenata, nego kod zdravih učesnika u našoj studiji (Slika 14 i Tabele 15 i 16). Pored toga, pokazali smo pozitivnu korelaciju između koncentracije TGF- β 1, uzrasta pacijenata i dužine trajanja dijabetesa (Tabela 17 i Tabela 19). U saglasnosti sa našim rezultatima, i u drugim studijama su dobijene značajno veće koncentracije TGF- β 1 kod dece sa T1DM, sa i bez prisutnih mikroangiopatskih komplikacija, u odnosu na zdravu populaciju, kao i direktna povezanost nivoa TGF- β 1 sa dužinom trajanja dijabetesa i uzrastom pacijenta (232,233). Koncentraciji TGF- β 1 u krvi, pored ćelija imunskog sistema, doprinose i ćelije drugih tkiva. Treba napomenuti da su koncentracije inflamatornih markera TGF- β 1, RAGE i hsCRP, kao i genska ekspresija TGF- β 1, u našoj studiji, bili značajno povezani sa T1DM, nezavisno od drugih demografskih i biohemijskih parametara (Tabela 59).

Prosklerotski i profibrotski efekti delovanja TGF- β 1 ga svrstavaju u značajne medijatore dijabetesne nefropatije, koja se karakteriše difuznom ekspanzijom ekstracelularnog matriksa (348). TGF- β 1 olakšava akumulaciju ekstracelularnog matriksa povećavajući stvaranje i stabilizaciju i suprimirajući njegovu degradaciju. Eksperimentalne studije na miševima sa T1DM i T2DM su pokazale da je primena neutrališućih anti-TGF β antitela predupredila pojavu glomeruloskleroze i tubulointercijalne fibroze i redukovala ekspresiju gena za fibronektin i kolagen tip IV koji ulaze u sastav ekstracelularnog matriksa (348,349). Ranije studije su ukazale da TGF- β 1 indukuje epitelijalno-mezenhimalnu tranziciju/transdiferencijaciju (EMT), proces gubitka diferencijacije epitelnih ćelija koje se, usled toga, transformišu u miofibroblaste, tip mezenhimalnih stem ćelija (350). Ova transformacija u bubregu utiče na ćelije koje normalno oblažu tubularnu bazalnu membranu i imaju visoko polarizovanu strukturu, što omogućava efikasnu reapsorpciju elektrolita i proteina. EMT procesom, epitelne ćelije gube polarnost i dobijaju sposobnost migracije i fibrogeneze (351). Pored tubula, TGF- β 1 indukuje EMT i u glomerularnim podocitima i glomerularnim parijetalnim ćelijama (352,353). Povećana koncentracija TGF- β 1 u bubregu se pripisuje povećanoj ekspresiji *in situ*, ali sistemsko povećanje koncentracije TGF- β 1 potiče i iz trombocita, koji su značajni rezervoar TGF- β 1. Ovaj efekat je naročito izražen u dijabetesu, koji je praćen povećanom fragilnošću trombocita (354). Istraživanja su pokazala da povećana, kao i smanjena ekspresija TGF- β 1 kod eksperimentalnih modela sa dijabetesom utiču na povećanje urinarne ekskrecije albumina, ali različitim intenzitetom (355). Iako deca sa mikroangiopatskim komplikacijama, uključujući

dijabetesnu nefropatiju, nisu bila uključena u našu studiju, genska ekspresija TGF- β 1 u PBMC je pokazala inverznu korelaciju sa urinarnom ekskrecijom albumina, dok korelacija između koncentracije ovog citokina u plazmi i ekskrecije albumina nije bila značajna (Tabela 19).

Istraživanja pokazuju da i endotelne ćelije krvnih sudova, pod uticajem TGF β izoformi, mogu da poprime formu miofibroblasta kroz proces endotelijalno-mezenhimalne tranzicije (EndMT) (356). Disfunkcija aktiviranog endotela u odgovoru na patofiziološke stimuluse se ogleda prisustvom proinflammatoryh medijatora, povećanoj permeabilnosti i akumulaciji leukocita i lipida u intimi i posledičnom formiranju penastih ćelija. U procesu EndMT endotelne ćelije gube ekspresiju svojih karakterističnih proteinskih markera i ćelijske funkcije, te prisvajaju karakteristike mezenhimalnih ćelija, kao što su sinteza ekstracelularnog matriksa i kontraktilne osobine. Glavni pokretači ovog procesa su TGF- β 1 i TGF- β 2 koji putem svojih Smad i alternativnih signalnih puteva aktivacije nuklearnih transkripcionih faktora indukuju inflamaciju, hipoksiju i oksidativni stres u endotelu (357). Pokazano je da proinflammatory citokini (IL-1b, IF- γ , TNF- α), aktiviraju transkripcione faktore što rezultuje povećanom ekspresijom TGF- β 1 i TGF- β 2, koji zatim indukuju EndMT. Učešće u EndMT, povezuje ulogu endotela u inicijaciji ateroskleroze sa kasnijim fazama napredovanja aterosklerotskog plaka (357). Dislipidemija, odnosno prisustvo povećane koncentracije oksidovanog LDL je dobro ustanovljeni činiac ranih faza ateroskleroze, a pokazano je da vezivanjem za LOX 1 receptore, *in vivo*, može da pokrene povećanu sintezu i aktivaciju TGF- β 1 u endotelnim ćelijama i olakša EndMT (358).

Ranije postavljena hipoteza o ateroprotektivnoj ulozi ovog citokina se oslanja, uglavnom, na *in vitro* eksperimente koji su pokazali njegovo antiinflamatorno, antiadhezivno delovanje na vaskularni endotel, antiproliferativno i antimigratorno delovanje na ćelije glatke muskulature ili suprimirajuće delovanje na T efektorske i ćelije urođenog imuniteta, na mestima aterosklerotskih lezija (223). Međutim, ispitivanje uloge TGF- β 1 kao potencijalno ateroprotektivnog ili proaterogenog markera je kod ljudi zasnovano, pre svega, na određivanju njegove koncentracije u plazmi ili genske ekspresije u dostupnim tkivima. Određivanje koncentracije TGF- β 1 je otežano prisustvom različitih latentnih formi ovog citokina, kao i različitih vezanih formi u kompleksu sa proteinima seruma i ekstracelularnog matriksa (359). Rezultati istraživanja su pokazali povećanje latentnog oblika, uz istovremeno sniženje aktivnog oblika TGF- β 1, kod osoba sa uznapredovalom aterosklerozom (359). Druge studije nisu pokazale razliku u koncentraciji TGF- β 1 između osoba sa i bez ateroskleroze (360), verovatno zbog nedostatka standardizacije upotrebljenih testova. Pored ovoga, pokazano je da koncentracija, dejstvo i mogući razvoj rezistencije receptora na delovanje ovog citokina, zavise od starosti pacijenta, stadijuma bolesti, tj. od međusobnog odnosa prisutnih faktora rizika (361). Eksperimentalno je pokazano da u aterosklerozi postoji poremećaj TGF β signalizacije, u smislu smanjene aktivacije ovog citokina, nishodne regulacije receptora, kao i aktivnosti intracelularnih signalnih puteva (226).

Značaj TGF- β 1 kao ranog markera ateroskleroze kod pacijenata sa T1DM smo određivali kroz ispitivanje korelacije sa lipoproteinskim subfrakcijama. Utvrdili smo negativnu korelaciju nivoa iRNK TGF- β 1 sa veličinom LDL čestica, kao i negativnu korelaciju koncentracije TGF- β 1 sa LDL subfrakcijama manjeg dijametra i malim gustim LDL česticama (Tabela 23). Utvrđena je i negativna korelacija ekspresije TGF- β 1 i manjih HDL 3b subfrakcija. Cirkulišuće koncentracije TGF- β 1 su bile u inverznom odnosu sa većim HDL 2a subfrakcijama a u pozitivnoj korelaciji sa manjim HDL 3b subfrakcijama (Tabela 25). Ukupno uzevši, naši rezultati su pokazali povezanost niskih koncentracija TGF- β 1 sa povišenim udelom većih, vazoprotektivnih HDL subfrakcija, ali i sa povećanim prisustvom proaterogenih malih gustih LDL subfrakcija. Istraživanja su pokazala da se veza između imunomodulatornog efekta TGF- β 1 i poremećaja metabolizma lipida ogleda u inhibiciji Th1 imunskog odgovora i posledičnoj inhibiciji efekata koje IFN- γ ostvaruje na makrofage (362). Eksperimentalno je pokazano da TGF- β 1 antagonizuje nishodnu regulaciju ABCA1 receptora na makrofagama pod dejstvom IFN- γ (362). Daljom evaluacijom potencijalne vrednosti TGF- β 1 kao markera ateroskleroze pokazana je direktna povezanost smanjenja ekspresije TGF- β 1 i porasta koncentracije TGF- β 1 sa pogoršanjem metaboličke kontrole, kod pacijenata sa T1DM (Tabele 41 i

42). Pored toga, uočen je i rast hsCRP kod pacijenata sa suboptimalnom i lošom metaboličkom kontrolom (Tabela 42). U skladu sa prethodno objašnjenim disfunkcionalnim HDL česticama u T1DM, sniženje nivoa iRNK TGF- β 1 bi moglo da ukaže na povećan intenzitet inflamacije, udružen sa dislipidemijom, koji ima potencijalno proaterogeno dejstvo.

Drugi marker inflamacije čiju smo gensku ekspresiju ispitali je RAGE. Pored proteina modifikovanih neenzimskom glikacijom, RAGE vezuje i molekule poput HMBG1 i S100A proteine, što ga svrstava u tzv. *scavenger* receptore koji su eksprimirani na mestima tkivne destrukcije izazvane inflamacijom i apoptozom. Zbog toga se ligandi koje vezuju RAGE receptori nazivaju i DAMP ligandima (eng. *damage molecular patterns*). Durning i saradnici su pokazali veću gensku ekspresiju RAGE u CD4+ i CD8+ ćelijama kod ispitanika sa visokim rizikom za razvoj T1DM i kod onih sa T1DM, u odnosu na zdrave ispitanike. U CD8+ je ekspresija RAGE bila značajno veća u odnosu na CD4+ ćelije (363). Eksperimentalno je dokazana sposobnost RAGE liganada da se transportuju kroz membranu T ćelija i da se vežu za intracelularno eksprimirani RAGE receptor, što moduliše aktivaciju i diferencijaciju T ćelija. Ovako aktivirani proinflamatorni mehanizmi su dokazani u periodu koji prethodi nastanku dijabetesa, a praćeni su sekrecijom proinflamatornih citokina (IL-17, IL-5 i CD107a) u T ćelijama i prethode poremećajima glikemije u tom periodu i manifestaciji T1DM. U skladu sa tim, povećana intracelularna ekspresija RAGE u T ćelijama može ukazati na rizik od nastanka T1DM (364,365). Zastupljenost izoformi RAGE u tkivima je različita i zavisi od posttranslacionih modifikacija. Dominantna forma je membranski RAGE, dok se u zavisnosti od patoloških uticaja menja intenzitet njegove enzimske modifikacije i koncentracija sRAGE u serumu, sa dokazanom razlikom između dijabetičara i zdravih osoba. (364).

U našoj studiji su nivoi iRNK RAGE u PBMC bili značajno niži, dok su koncentracije sRAGE u plazmi bile značajno više kod pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike (Slika 14 i Tabele 15 i 16). Miura i saradnici su dokumentovali sniženu ekspresiju RAGE u izolovanim monocitima kod ispitanika sa T1DM ali samo u grupi sa ispoljenim mikrovaskularnim komplikacijama (366), dok u istoj studiji nije bilo razlike u ekspresiji RAGE kod dijabetičara bez mikrovaskularnih komplikacija i zdravih ispitanika. Pored toga, pokazano je da se nivoi iRNK RAGE značajno smanjuju u kulturi monocita koji su izloženi delovanju AGE, ali ne i kada su izloženi dejstvu insulina ili glukoze (366), sugerišući na presudnu ulogu raspoloživih liganada RAGE na njegovu ekspresiju.

Prospektivna DIPP (eng. *Diabetes Prediction and Prevention*) studija je pokazala opadanje koncentracije sRAGE kod dece tokom razvoja T1DM, počevši od faze predijabetesa, preko serokonverzije, do progresije u T1DM (367). Autori studije ukazuju na postojanje protektivnih mehanizama solubilnih izoformi RAGE od toksičnog delovanja AGE, kao i na slabljenje tih mehanizama, počev od serokonverzije do manifestacije dijabetesa (367). Saglasno sa našim rezultatima, povišena koncentracija sRAGE kod dece sa T1DM je dokumentovana u studiji Dettoraki i saradnika (368). Međutim, isti autori nisu našli značajnu razliku između genske ekspresije RAGE kod dijabetičara i zdrave dece. Koncentracije N-karboksi metil-lizina (CML), produkta uznapredovale glikacije proteina, se nisu razlikovale kod dijabetičara i zdravih ispitanika, što navodi na zaključak o protektivnom vezivanju AGE-sRAGE u cirkulaciji obolelih, odnosno o eliminaciji produkata uznapredovale glikacije (368). Istraživanjem sprovedenim kod pedijatrijskih pacijenata sa T1DM i T2DM pokazani su povišeni nivoi esRAGE i direktna korelacija između sRAGE i esRAGE sa nivoima pentozidina, još jednog predstavnika produkata uznapredovale glikacije proteina, što ukazuje da bi solubilne izoforme RAGE mogle da budu markeri potencijalnih komplikacija usled uznapredovale glikacije kod dijabetičara pedijatrijskog uzrasta (369).

Postoji očigledna veza između koncentracije AGE i ekspresije RAGE u različitim tkivima (370), a kako su dominantne solubilne izoforme nastale enzimskim delovanjem, pre svega matriks metalopeptidaza (MMP), na receptor eksprimiran na površini ćelije, dokazana je veza između koncentracije AGE i aktivnosti MMP. U ovom kontekstu, pokazano je da AGE indukuju ekspresiju i sekreciju MMP-9 u makrofagama (371), kao i sintezu ovog enzima u ćelijama krvnih sudova dijabetičara (372). Takođe, produkti oksidativnog stresa koji su povišeni usled interakcije AGE-

RAGE, povećavaju ekspresiju i aktivnost MMP (372). Enzimaska aktivnost MMP u cirkulaciji obolelih povećava i koncentraciju sRAGE, ali očigledno nedovoljno da spreči oštećenje tkiva u pratećim komplikacijama dijabetesa, jer količina formiranih AGE prevazilazi protektivnu sposobnost sRAGE. Naime, koncentracije sRAGE u plazmi su približno 1000 puta niže od potrebnih za efikasno vezivanje i eliminaciju AGE (373). Rezultati koje su objavili Nin i saradnici pokazuju visoke koncentracije sRAGE kod pacijenata sa kardiovaskularnim komplikacijama, albuminurijom i retinopatijom, kao i pozitivnu korelaciju sRAGE i AGE, što navodi na zaključak da su sRAGE disfunkcionalne kao „mamci” koji sprečavaju toksično dejstvo produkata uznapedovale glikacije (374). Razlike u koncentraciji solubilnih izoformi RAGE i ekspresiji RAGE kod pacijenata sa T1DM u objavljenim studijama proističu, najverovatnije iz razlika u dužini trajanja bolesti, i prisustvu udruženih patoloških stanja. Analizom povezanosti ekspresije i koncentracije inflamatornih markera sa tradicionalnim faktorima za razvoj ateroskleroze ispitivali smo njihov potencijalni zajednički uticaj na razvoj makrovaskularnih komplikacija. Pokazali smo pozitivnu korelaciju koncentracije sRAGE sa koncentracijom ukupnog, LDL-H i non-HDL-H (Tabela 21). U saglasnosti sa našim rezultatima su i rezultati Dettoraki i saradnika, koji su našli direktnu korelaciju sRAGE i LDL-H (368).

Druga klinička istraživanja su pokazala asocijaciju niskih koncentracija sRAGE i esRAGE sa visokim rizikom za razvoj KVB i drugih komplikacija T1DM (375,376). Katakami i saradnici su u longitudinalnoj studiji tokom 4 godine pratili odnos između solubilnih formi RAGE i cIMT kao markera rane ateroskleroze kod adolescenata sa T1DM i pokazali da su niske koncentracije sRAGE i esRAGE nezavisno povezane sa progresivnim zadebljanjem intime karotidnih arterija (375). S druge strane, longitudinalna studija koja je uključila decu i adolescente sa T1DM nije pokazala protektivni efekat visokih koncentracija solubilnih formi RAGE (sRAGE i esRAGE) na pojavu rane ateroskleroze, procenjene na osnovu kliničkih markera - povećanih vrednosti cIMT i krutosti arterija (377). U skladu sa tim nalazom su rezultati EURODIAB studije gde je nađeno da su visoke koncentracije sRAGE kod odraslih ispitanika sa T1DM udružene sa KVB i povećanim mortalitetom (378). U okviru iste studije je dokazano da su koncentracije sRAGE nezavisni prediktori KVB u T1DM, koja je delimično posredovana učešćem RAGE u endotelnoj i renalnoj disfunkciji i inflamaciji niskog stepena (374). RAGE na površini endotelnih ćelija, po vezivanju za ligande iz cirkulacije, dovodi do aktivacije i translokacije nuklearnih transkripcionih faktora i transkripcije ciljnih gena za VCAM-1, E-selektin i proinflamatorne citokine (373,379). Kao što je ranije objašnjeno, AGE ligandi su pozitivni regulatori RAGE ekspresije, ali i povećanog stvaranja solubilnih formi RAGE. Linearno povećanje koncentracije sRAGE kao posledice povećane RAGE ekspresije, bi se moglo objasniti poremećajem sprege AGE-RAGE u T1DM, koji vodi u endotelnu disfunkciju i inflamaciju, što prethodi kardiovaskularnim komplikacijama bolesti (374). Rezultati naše studije su pokazali značajnu povezanost neadekvatne metaboličke kontrole i povišenih koncentracija sRAGE i hsCRP (Tabela 42), što ukazuje na povećano proinflamatorno i proaterogeno delovanje AGE u toj grupi pacijenata, koje je paraćeno kompenzatorno povećanim stvaranjem sRAGE. U skladu sa utvrđenom pozitivnom korelacijom sa proaterogenim parametrima lipidnog profila (Tabela 21), sRAGE ima potencijalnu vrednost kao marker rane ateroskleroze u dijabetesu. Nishodna regulacija genske ekspresije RAGE receptora povezana sa neadekvatnom metaboličkom kontrolom (Tabela 41), je moguća posledica visoke koncentracije solubilnih formi sRAGE u cirkulaciji. Saglasno tome, genska ekspresija RAGE i koncentracije sRAGE kod pacijenata sa T1DM nisu bile u korelaciji, kao ni genska ekspresija i koncentracije TGF- β 1. Pozitivna korelacija je konstatovana između nivoa iRNK i između koncentracija oba markera (Slike 15 i 16).

Dalje, ispitivanjem korelacije genske ekspresije i koncentracije inflamatornih markera sa lipidnim markerima kod pacijenata sa T1DM, nismo dokazali korelaciju između relativnih udela LDL i HDL subfrakcija i ekspresije RAGE i koncentracije sRAGE (Tabela 23 i Tabela 25). Jedno od mogućih objašnjenja proizilazi iz istraživanja sprovedenih na eksperimentalnim modelima, u cilju rasvetljavanja uloge RAGE u aterosklerozi u T1DM. Delecija RAGE receptora kod *ApoE*^{-/-} miševa, koji su u studiji korišćeni kao model ateroskleroze, je značajno smanjila stepen ateroskleroze u

odnosu na *ApoE*^{-/-} životinje koje su imale RAGE receptore. Međutim delecija RAGE u ovom eksperimentu nije pokazala efekat na koncentracije glukoze i lipoproteina (379).

Veza između inflamacije i dislipidemije u T1DM ispitivali smo i na osnovu korelacija između nivoa iRNC i koncentracije TGF- β 1 i RAGE sa PCSK9, kao i preko korelacije koncentracija hsCRP i PCSK9. Rezultati naše studije su pokazali značajnu korelaciju između hsCRP i PCSK9 kod pacijenata sa T1DM, dok kod zdravih ispitanika nije bilo značajne korelacije, ukazujući na specifičnost odnosa inflamacije niskog stepena i regulacije lipidnih komponenti kod populacije koja je u riziku od nastanka ateroskleroze. CRP je najpoznatiji marker inflamatornih procesa i najviše proučavan prediktor KVB, posebno koronarnih bolesti srca. Smatra se da CRP ima ulogu u aterogenezi jer pojačava lokalnu inflamaciju vaskularnog endotela indukcijom komplemента (380), olakšava infiltraciju monocita u intimu mediju krvnih sudova i pojačava ekspresiju adhezionih molekula, citokina i hemokina u endotelnim ćelijama, kao i sintezu proinflamatornih interleukina u makrofagama (381). Pored toga, CRP smanjuje vazodilatatorno delovanje NO inhibirajući aktivnost NO sintaze, te podstiče apoptozu endotelnih i glatkih mišićnih ćelija u aterosklerotskoj leziji (382). Dokazano je da CRP indukuje LOX-1 receptore na endotelnim ćelijama čime se podstiče adhezija monocita i preuzimanje oksidovanog LDL (383). Pretpostavlja se da proces opsonizacije LDL čestica C-reaktivnim proteinom olakšava njihov transport u makrofage i nastanak penastih ćelija (384). S druge strane, pokazano je da HDL neutrališe proinflamatorno dejstvo CRP-a suprimirajući indukciju adhezionih molekula i proinflamatornih citokina (385). Veza između inflamatornih i lipidnih markera ateroskleroze je pokazana u JUPITER (eng. *Justification for the Use of statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin*) studiji, koja je pokazala značajno smanjenje incidence KVB nakon terapije statinima kod osoba sa LDL-H < 3,36 mmol/L i hsCRP \geq 2mg/L (386). Veza između PCSK9 i proaterogenih lipidnih parametara je dobro poznata, ali uloga PCSK9 u inflamaciji još nije dovoljno razjašnjena. Studija ATHEROREMO-IVUS (eng. *The European Collaborative Project on Inflammation and Vascular Wall Remodeling in Atherosclerosis - Intravascular Ultrasound*) je prikazala pozitivnu linearnu vezu između PCSK9 i veličine koronarnog aterosklerotskog plaka. Eksperimentalno je pokazano da PCSK9 ima ulogu u intenziviranju inflamacije tokom progresije ateroskleroze, kao i da inhibicija PCSK9 može da ublaži inflamatornu reakciju (387). Takođe, kod apoE^{-/-} miševa, gašenje PCSK9 gena je ograničilo aterogenezu i smanjilo broj makrofaga u plaku (388). Uprkos tome, rezultati kliničkih studija koje su ispitivale efekte inhibitora PCSK9 su pokazali da ova terapija nema uticaja na koncentraciju hsCRP-a (389,390). Ovi rezultati su bili nezavisni od vrste i trajanja primenjene terapije i karakteristika ispitanika (389).

T1DM je, kao hronična metabolička bolest nastala u detinjstvu, praćena vaskularnim komplikacijama koje se najčešće manifestuju u adultnom uzrastu (48). Mikroalbuminurija je dobro ustanovljen faktor rizika za razvoj dijabetesne nefropatije, kao i nezavisni prediktor endotelne disfunkcije i rani marker kardiovaskularnih bolesti (236). Procenjeno je da se kod 2-18% osoba koje su obolele od T1DM u detinjstvu, u narednih 20 godina detektuje mikroalbuminurija (391,392), ali da kod polovine zabeleženih slučajeva, ona ima prolazni karakter (239). Ispitivanje ekskrecije albumina u urinu je već dugo prihvaćeno kao skrining test za detekciju dijabetesne nefropatije, gde je pojava mikroalbuminurije ukazuje na rizik za razvoj makroalbuminurije i progresiju renalne bolesti. Međutim, noviji dokazi o visokom stepenu reverzibilnosti mikroalbuminurije (393) u normoalbuminuriju, kao i o smanjenju renalne funkcije pre pojave mikroalbuminurije (394), su ukazali na potrebu za dodatnim markerima dijabetesne nefropatije i kardiovaskularnog rizika u T1DM.

Kod adolescenata i odraslih pacijenata sa T1DM je utvrđena direktna povezanost mikroalbuminurije sa dužinom trajanja dijabetesa, suboptimalnom glikemijskom kontrolom, hipertenzijom i pušenjem (239,395,396). Kod dece sa T1DM incidenca mikroalbuminurije raste u pubertetu (396), usled izražene fiziološke insulinske rezistencije (397). Noviji dokazi pokazuju da rani porast brzine ekskrecije albumina, čak i kad su vrednosti u okviru referentnih granica, ima prediktivni značaj za razvoj mikro i makroalbuminurije posle puberteta (239,398).

Stone i saradnici su u retrospektivnoj studiji ispitivali trend ekskrecije albumina kod dece i adolescenata sa približnim trajanjem T1DM oko 7 godina. Kriterijum za normoalbuminuriju je bila ekskrecija $<7,5 \mu\text{g}/\text{min}$, za graničnu mikroalbuminuriju ekskrecija od $7,5$ do $20 \mu\text{g}/\text{min}$, a za mikroalbuminuriju $> 20 \mu\text{g}/\text{min}$ i to ukoliko se ustanovi 2 puta u toku tri meseca i ne povuče se u toku 12 meseci (240). Granična vrednost za normoalbuminuriju $<7,5 \mu\text{g}/\text{min}$ je odgovarala 95. percentilu za zdravu decu (396). Rezultati ove studije su pokazali da je granično povećanje ekskrecije albumina, uprkos tome što je u referentnom opsegu, prediktor perzistentne mikroalbuminurije, što je u saglasnosti i sa rezultatima AdDit studije i drugih istraživanja (399). Takođe pokazano je da uzrast pri nastanku bolesti i duže trajanje dijabetesa povećavaju rizik za razvoj mikroalbuminurije (240). Ispitanicima u našoj studiji nisu ustanovljene komplikacije dijabetesa, pa ni mikroalbuminurija. Zato je procena ekskrecije albumina izvršena podelom pacijenata na osnovu kvartilnih vrednosti, pri čemu su pacijenti u najvišem, četvrtom kvartilu imali vrednosti koje odgovaraju ranom povećanju brzine ekskrecije ili graničnim vrednostima mikroalbuminurije $>7,5 \mu\text{g}/\text{min}$ (240,399). U saglasnosti sa rezultatima drugih studija, naši pacijenti kojima je izmerena najniža ekskrecija albumina, su bili značajno mlađi od pacijenata sa većom ekskrecijom (Tabela 51), što je bilo očekivano, jer duže trajanje dijabetesa povećava rizik od komplikacija.

Kliničke i eksperimentalne studije su pokazale uticaj dislipidemije u razvoju mikroalbuminurije i dijabetesne nefropatije (400), a poznato je da su lipidne abnormalnosti praćene albuminurijom kod dijabetičara, čak i u odsustvu drugih manifestacija renalne insuficijencije (236). EURODIAB studija nije potvrdila korelaciju između parametara lipidnog statusa i kardiovaskularnog rizika kod T1DM pacijenata sa normoalbuminurijom, ali je u grupi sa mikroalbuminurijom kardiovaskularni rizik bio povezan sa hipertrigliceridemijom, povećanim LDL-H i manjom veličinom lipoproteinskih čestica (401). Eksperimentalne i kliničke studije su pokazale da su mezangijalne, tubulointercijalne i glomerularne promene udružene sa proaterogenim lipidnim profilom kod obolelih od T1DM (400), dok su rezultati Steno studije pokazali da regulacija hiperholesterolemije utiče na regresiju mikroalbuminurije, što ukazuje na udruženu prognostičku vrednost lipida i ekskrecije albumina u proceni rizika za nastanak dijabetesne nefropatije i makrovaskularnih komplikacija (393).

U humanim glomerulima, preuzimanje lipida u mezangijalne i endotelne ćelije se vrši preko specifičnih receptora. LDL čestice, koje su modifikovane glikozilacijom i oksidacijom, preuzimaju se preko *scavenger* receptora i akumuliraju u infiltrirane monocite u mezangijumu uz posledičnu diferencijaciju monocita u makrofage i formiranje penastih ćelija (402). Pokazano je da oksidovani lipoproteini stimulišu mezangijalne ćelije na lučenje hemotaktičkih faktora i adhezionih molekula što amplifikuje inflamatornu reakciju i predstavlja značajan faktor u patogenezi glomeruloskleroze i tubularne fibroze, posebno u dijabetesnoj nefropatiji. Renalne makrofage stimulišu oslobađanje slobodnih kiseoničnih radikala i oslobađaju faktore rasta kao što je PDGF-AB (eng. *platelet-derived growth factor-AB*) i TGF- β 1. TGF- β 1 je prepoznat kao značajan medijator ekspanzije mezangijalnog matriksa posredovane lipidima. Pored toga, tubularno-intersticijalno oštećenje, indukovano dislipidemijom, je praćeno značajnom infiltracijom makrofaga i paralelnim povećanjem ekspresije TGF- β 1 u ćeljama intersticijuma (404-405).

Kliničke studije koje su obuhvatile grupe pacijenata sa T1DM adolescentnog i adultnog uzrasta, sa normo-, mikro- i makroalbuminurijom su pokazale da su proaterogeni lipidni poremećaji povezani sa perzistentnom albuminurijom. Povišena koncentracija LDL-H je bila praćena povećanjem IDL i malih gustih LDL subfrakcija, dok su udeli većih LDL subfrakcija bili sniženi. Veza između parametara lipidnog profila i ekskrecije albumina u ovoj studiji je bila nezavisna od glikemijske kontrole (406). Marcovecchio i saradnici su kod dece i adolescenata sa T1DM pokazali da je porast ekskrecije albumina udružen sa porastom ukupnog i non-HDL-H, nezavisno od postignute metaboličke kontrole, uzrasta, pola, trajanja dijabetesa i ITM (407). Kod učesnika AdDit studije koji su imali ekskreciju albumina u okviru referentnih vrednosti, u grupi pacijenata u gornjem tercilu vrednosti ekskrecije, detektovana je hiperlipidemija i povećana krutost arterija, kao ispitivani marker subkliničke ateroskleroze (235). Pored ovoga, rani znaci ateroskleroze koji su dokazani

izmerenim zadebljanjem aIMT, su bili nezavisno povezani sa LDL-H, uzrastom, sistolnim krvnim pritiskom i ranom ekskrecijom albumina (235). Suprotno od navedenih istraživanja, učesnici naše studije, u najvišem kvartilu ekskrecije albumina su imali značajno niže koncentracije LDL-H u odnosu na ostale kvartile (Tabela 52), kao i višu zastupljenost LDL subfrakcija većeg dijametra u odnosu na pacijente sa najmanjom brzinom ekskrecije albumina (Tabela 53). Očekivano, kod pacijenata čija je ekskrecija albumina odgovarala IV kvartilu, nađen je veći udeo malih HDL čestica (Tabela 54). Dalje, pokazali smo da je kod pacijenata čija je urinarna ekskrecija albumina odgovarala IV kvartilu, odnosno kriterijumima rane ekskrecije, bila snižena ekspresija TGF- β 1 u PBMC (Tabela 56 i slika 24). Rezultati univarijantne regresione analize su pokazali da je nishodna regulacija RAGE i TGF- β 1 povezana sa pojačanom ekskrecijom albumina. Multivarijantna regresiona analiza je izdvojila sniženu ekspresiju TGF- β 1 kao marker ranog povećanja brzine ekskrecije albumina, nezavisno od pola i uzrasta pacijenta, krvnog pritiska, koncentracije kreatinina i HbA_{1c}. Povezanost snižene ekspresije TGF- β 1 i povećane ekskrecije albumina je ostala značajna i nakon korekcije za koncentracije inflamatornih markera, nivoa iRNK RAGE i postignute metaboličke kontrole (Tabela 58). Pacijenti u našoj studiji su imali više koncentracije TGF- β 1 u odnosu na zdrave ispitanike što ukazuje na njegovo potencijalno poreklo iz bubrega usled povećane lokalne ekspresije, ali je izostala korelacija koncentracije TGF- β 1 sa ekskrecijom albumina, kao i razlika u koncentracijama TGF- β 1 po kvartilima albuminske ekskrecije (Tabele 19 i 57, slika 24). Pokazani rast koncentracija kreatinina sa porastom ekskrecije albumina (Tabela 52) je verovatno posledica trenutne bubrežne funkcije, ali i potencijalni indikator za praćenje poremećaja bubrežne funkcije kod pacijenata sa T1DM.

Treba istaći da uzrok albuminurije nije u potpunosti razjašnjen. Novije studije pokazuju da promene u morfologiji glomerula nisu jedini uzrok mikroalbuminurije u dijabetesnoj nefropatiji. TGF- β 1 povećava akumulaciju ekstracelularnog matriksa kroz stimulaciju sinteze kolagena tip IV i fibronektina, što dovodi do razvoja intersticijalne fibroze i glomerularne skleroze. Pored toga, TGF- β 1 redukuje aktivnost lizozomalnih enzima što ima kao posledicu poremećenu razgradnju komponenti matriksa i dodatno doprinosi fibrozi organa poput bubrega i srca (408). TGF- β 1 je direktno uključen u mehanizme reapsorpcije, odnosno ekskrecije albumina posle glomerularne filtracije, ali je moguće da i drugi citokini, kroz aktivaciju TGF- β 1 ili nezavisno od njega, utiču na ekskreciju albumina u oboljenjima poput dijabetesa. Visoki nivoi glukoze su inicirajući faktor za hormonsku stimulaciju i lokalnu ushodnu regulaciju i stimulaciju faktora rasta (409). Hipoteza Deckerta i saradnika da je bubrežna funkcija refleksija vaskularne funkcije u organizmu bi mogla da objasni povezanost pojačane ekskrecije albumina sa poremećajem koronarnih i perifernih krvnih sudova (237). Kompleksni mehanizmi koji povezuju endotelnu disfunkciju i hroničnu inflamaciju, a reflektuju se mikroalbuminurijom, odraz su multiplih poremećaja koje leže u osnovi razvoja aterosklerotskih promena u kardiovaskularnom sistemu.

6. Zaključci

1. Pedijatrijski pacijenti sa T1DM na intenzivnoj insulinskoj terapiji su imali značajno više koncentracije HDL-H i niži udeo malih, gustih LDL čestica u odnosu na zdravu decu. Raspodela HDL čestica kod pacijenata sa T1DM je bila pomešana ka manjim HDL 3 subfrakcijama. Broj ispitanika sa dislipidemijom je bio značajno veći u grupi sa T1DM.
2. Koncentracije PCSK9 u plazmi pedijatrijskih pacijenata sa T1DM se nisu značajno razlikovale od koncentracija kod zdrave dece. U grupi sa T1DM nisu utvrđene razlike u koncentracijama PCSK9 po polu.
3. Kod pacijenata sa T1DM koncentracije PCSK9 su značajno rasle sa pogoršanjem metaboličke kontrole i pozitivno korelirale sa udelom HbA_{1c}. Pacijenti sa većim stepenom insulinske rezistencije su imali više koncentracije PCSK9.
4. Sa porastom koncentracija PCSK9 u plazmi pacijenata sa T1DM, rasle su koncentracije ukupnog holesterola, LDL-H, non-HDL-H i TG. Kod zdrave dece nije utvrđena korelacija između koncentracija PCSK9 i parametara lipidnog statusa.
5. Pacijenti sa neadekvatnom metaboličkom kontrolom i povišenim koncentracijama LDL-H su imali značajno više koncentracije PCSK9 u odnosu na pacijente sa istim stepenom postignute metaboličke kontrole i optimalnim koncentracijama LDL-H. Kod pacijenata sa dobrom metaboličkom kontrolom nije uočena razlika u koncentracijama PCSK9 u zavisnosti od koncentracije LDL-H.
6. Kod pacijenata sa dobrom metaboličkom kontrolom, viši nivoi PCSK9 su bili udruženi sa većim LDL dijametrima i nižim udelima sdLDL čestica. U grupi pacijenata sa neadekvatnom metaboličkom kontrolom više koncentracije PCSK9 su bile udružene sa većim udelima malih HDL 3c subfrakcija i višim koncentracijama TG.
7. Genska ekspresija TGF-β1 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa T1DM je bila značajno niža, a koncentracije TGF-β1 u plazmi značajno više nego kod zdrave dece. Koncentracije TGF-β1 u plazmi pacijenata sa T1DM su bile u pozitivnoj korelaciji sa starijim uzrastom i dužim trajanjem bolesti.
8. Genska ekspresija RAGE u mononuklearnim ćelijama periferne krvi je bila značajno niža u grupi pacijenata sa T1DM nego u grupi zdrave dece. Koncentracije sRAGE u plazmi pacijenata sa T1DM su bile značajno više od koncentracija u plazmi zdrave dece.
9. Sa pogoršanjem metaboličke kontrole T1DM genska ekspresija TGF-β1 i RAGE u mononuklearnim ćelijama periferne krvi se snižavala, a koncentracije TGF-β1 i sRAGE su rasle.
10. U grupi pacijenata sa T1DM genska ekspresija TGF-β1 je bila u inverznoj korelaciji sa veličinom LDL čestica i udelima malih HDL 3b subfrakcija. Koncentracija TGF-β1 u plazmi je bila u pozitivnoj korelaciji sa relativnim udelom LDL II i HDL 3b čestica, a negativnoj sa udelima HDL 2a, LDL III i IV subfrakcija. Koncentracije sRAGE u plazmi su pozitivno korelirale sa koncentracijama ukupnog holesterola, LDL-H i non-HDL-H.

11. Snižena ekspresija TGF- β 1 je bila povezana sa ranim povećanjem brzine ekskrecije albumina, nezavisno od pola, uzrasta, krvnog pritiska, koncentracija kreatinina i udela HbA_{1c}. Utvrđena veza između snižene ekspresije TGF- β 1 i povećane ekskrecije albumina je ostala značajna i nakon korekcije za koncentracije inflamatornih markera, nivo genske ekspresije RAGE i stepen postignute metaboličke kontrole
12. Pacijenti sa T1DM i pridruženim autoimunskim bolestima su imali značajno niže koncentracije HDL-H u odnosu na pacijente bez pridruženih bolesti. Najviše vrednosti indeksa ateroskleroze, najniže koncentracije HDL-H i najmanji dijametri HDL čestica su utvrđeni u grupi pacijenata sa pridruženom CB.
13. Pacijenti sa pridruženim autoimunskim bolestima su imali tri puta veću verovatnoću za snižene koncentracije HDL-H, nezavisno od prisustva tradicionalnih faktora rizika za makrovaskularne komplikacije dijabetesa.

7. Literatura

1. Mayer-Davis E, Kahkoska AR, Jefferies C, Dabelea D, Balde N, Gong CX, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2018; 19: 7-19.
2. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje Diabetes Mellitus-a. Beograd: Agencija za akreditaciju zdravstvenih ustanova Srbije; 2012.
3. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018; 391: 2449-62.
4. Patterson CC, Harjutsalo V, Rosenbauer J, Neu A, Cinek O, Skrivarhaug T, et al. Trends and cyclical variation in the incidence of childhood type 1 diabetes in 26 European centres in the 25 year period 1989-2013: a multicentre prospective registration study *Diabetologia*. 2019;62:408-17.
5. Vukovic R, Jesic MD, Vorgucin I, Stankovic S, Folic N, Milenkovic T, et al. First report on the nationwide incidence of type 1 diabetes and ketoacidosis at onset in children in Serbia: a multicenter study. *Eur J Pediatr*. 2018;177:1155-62.
6. You WP, Hanneberg M. Type 1 diabetes prevalence increasing globally and regionally: the role of natural selection and life expectancy at birth. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2016;4:e000161.
7. Miller RG, Mahajan HD, Costacou T, Sekikawa A, Anderson SJ, Orchard TJ. A Contemporary Estimate of Total Mortality and Cardiovascular Disease Risk in Young Adults With Type 1 Diabetes: The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes Care*. 2016;39:2296-303.
8. Patterson C, Guariguata L, Dahlquist G, Soltész G, Ogle G, Silink M. Diabetes in the young - a global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;103:161-75.
9. Nguyen C, Varney MD, Harrison LC, Morahan G. Definition of high-risk type 1 diabetes HLA-DR and HLA-DQ types using only three single nucleotide polymorphisms. *Diabetes*. 2013;62:2135-140.
10. Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, Concannon P et al. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk. *Diabetes*. 2008;57:1084-1092.
11. Knip M. Pathogenesis of type 1 diabetes: implications for incidence trends. *Horm Res Paediatr*. 2011;76:57-64.
12. Pociot F. Type 1 diabetes genome-wide association studies: not to be lost in translation. *Clin Transl Immunology*. 2017; 6:e162.
13. Redondo MJ, Steck AK, Pugliese A. Genetics of type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2018;19:346-53.
14. Onengut-Gumuscu S, Ewens KG, Spielman RS, Concannon P. A functional polymorphism (1858C/T) in the PTPN22 gene is linked and associated with type 1 diabetes in multiplex families. *Genes Immun*. 2004;5:678-80.
15. de Jong VM, Zaldumbide A, van der Slik AR, Laban S, Koeleman BP, Roep BO. Variation in the CTLA4 3'UTR has phenotypic consequences for autoreactive T cells and associates with genetic risk for type 1 diabetes. *Roep BO. Genes Immun*. 2016;17:75-8.
16. Yang JH, Cutler AJ, Ferreira RC, Reading JL, Cooper NJ, Wallace C, et al. Natural variation in interleukin-2 sensitivity influences regulatory T-Cell frequency and function in individuals with long-standing type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2015;64:3891-902.
17. Winkler C, Lauber C, Adler K, Grallert H, Illig T, Ziegler AG, Bonifacio E. An interferon-induced helicase (IFIH1) gene polymorphism associates with different rates of progression from autoimmunity to type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011;60:685-90.

18. Cooper JD, Smyth DJ, Walker NM, Stevens H, Burren OS, Wallace C et al. Inherited variation in vitamin D genes is associated with predisposition to autoimmune disease type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011;60:1624-31.
19. Rodriguez-Calvo T. Enteroviral Infections as a Trigger for Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep*. 2018;18:106.
20. Mustonen N, Siljander H, Peet A, Tillmann V, Härkönen T, Ilonen J, et al. Early childhood infections precede development of beta-cell autoimmunity and type 1 diabetes in children with HLA-conferred disease risk. *Pediatr Diabetes*. 2018;19:293-9.
21. Filippi CM, Herrath MG. Viral trigger for Type 1 diabetes. *Diabetes*. 2008;57:2863-71.
22. Chia JSJ, McRae JL, Enjapoori AK, Lefèvre CM, Kukuljan S, Dwyer KM. Dietary Cows' Milk Protein A1 Beta-Casein Increases the Incidence of T1D in NOD Mice. *Nutrients*. 2018;10:9.
23. Ziegler AG, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA*. 2003; 290:1721-8.
24. Holmberg H, Wahlberg J, Vaarala O, Ludvigsson J; ABIS Study Group. Short duration of breast-feeding as a risk-factor for beta-cell autoantibodies in 5-year-old children from the general population. *Br J Nutr*. 2007;97:111-6.
25. Hummel M, Bonifacio E, Naserke HE, Ziegler AG. Elimination of dietary gluten does not reduce titers of type 1 diabetes-associated autoantibodies in high-risk subjects. *Diabetes Care*. 2002;25:1111-6.
26. Sørensen IM, Joner G, Jenum PA, Eskild A, Torjesen PA, Stene LC. Maternal serum levels of 25-hydroxy-vitamin D during pregnancy and risk of type 1 diabetes in the offspring. *Diabetes*. 2012;61:175-8.
27. Zipitis CS, Akobeng AK. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child*. 2008;93:512-7.
28. Lamb MM, Yin X, Barriga K, Hoffman MR, Barón AE, Eisenbarth GS, et al. Dietary glycemic index, development of islet autoimmunity, and subsequent progression to type 1 diabetes in young children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:3936-42.
29. Sepa A, Wahlberg J, Vaarala O, Frodi A, Ludvigsson J. Psychological stress may induce diabetes-related autoimmunity in infancy. *Diabetes Care*. 2005;28:290-95.
30. Rewers M, Ludvigsson J. Environmental risk factors for type 1 diabetes. *Lancet*. 2016; 387: 2340–48.
31. Marleau AM, Summers KL, Singh B. Differential contributions of APC subsets to T cell activation in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 2008;180:5235-49.
32. Turley S, Poirot L, Hattori M, Benoist C, Mathis D. Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *J Exp Med*. 2003;198:1527-37.
33. Pang S, Zhang L, Wang H, Yi Z, Li L, Gao L, et al. CD8(+) T cells specific for beta cells encounter their cognate antigens in the islets of NOD mice. *Eur J Immunol*. 2009;39:2716-24.
34. Lehuen A, Diana J, Zacccone P, Cooke A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10:501-13.
35. Mathis D, Vence L, Benoist C. beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature*. 2001; 414:792-8.
36. Wong S, Wen L. B cells in autoimmune diabetes. *Rev Diabet Stud*. 2005; 2:121–135.
37. Serreze DV, Fleming SA, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch R. B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new “speed congenic” stock of NOD.Igμ null mice. *J Exp Med*. 1996;184: 2049–53.
38. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE, Goland R, et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of β-cell function. *N Engl J Med*. 2009;361: 2143–52.

39. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2009; 155:173–81.
40. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 Diabetes. *Lancet*. 2014; 383:69-82.
41. Watkins R, Evans-Molina C, Blum JS, Dimeglio LA. Established and emerging biomarkers for the prediction of type 1 diabetes: a systematic review. *Transl Res*. 2014; 164: 110–21.
42. Pihoker C, Gilliam LK, Hampe CS, Lernmark A. Autoantibodies in Diabetes. *Diabetes*. 2005; 54: S52-S61.
43. Ziegler AG, Rewers M, Simell O, Simell T, Lempainen J, Steck A, et. Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *JAMA*. 2013;309:2473-9.
44. Danne T, Phillip M, Buckingham BA, Jarosz-Chobot P, Saboo B, Urakami T et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Insulin treatment in children and adolescents with diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2018;19:115–135.
45. Jacobson AM, Musen G, Ryan CM, Silvers N, Cleary P, Waberski B, Burwood A, et al. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group Long-term effect of diabetes and its treatment on cognitive function. *N Engl J Med*. 2007;356:1842-52.
46. Thalange N, Bereket A, Jensen LB, Hiort LC, Peterkova V. Development of Insulin Detemir/Insulin Aspart Cross-Reacting Antibodies Following Treatment with Insulin Detemir: 104-week Study in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes Aged 2-16 Years. *Diabetes Ther*. 2016;7:713-24.
47. Tieu C, Lucas EJ, DePaola M, Rosman L, Alexander C. Efficacy and safety of biosimilar insulins compared to the irreference products: A systematic review. *PLoS ONE*. 2018; 13:e0195012.
48. Donaghue KC, Marcovecchio L, Wadwa RP, Chew EY, Wong TY, Calliari LE, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Microvascular and macrovascular complications in children and adolescents *Pediatr Diabetes* 2018; 19: 262–74.
49. Sharma H, Lencioni M, Narendran P. Cardiovascular disease in type 1 diabetes. *Cardiovasc Endocrinol Metab*. 2019; 8:28-34.
50. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005;54:1615–25.
51. Forbes MJ, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*. 2013;93:137-88.
52. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010;107:1058-70.
53. Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:S233–36.
54. Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest*. 1998; 101: 160–9.
55. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 12222–6.
56. Geraldles P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms & its impact on diabetic complications. *Circ Res*. 2010; 106: 1319–31.
57. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114:597–605.
58. Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengeller Z, Szabo C, et al. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest*. 2003;112:1049–57.

59. Pirola L. The DCCT/EDIC study: epigenetic clues after three decades. *Diabetes*. 2014;63:1460–2.
60. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ. Diabetes Control and Complications Trial/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;353:2643–53.
61. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet*. 1998;352:837–53.
62. Soedamah-Muthu S, Chaturvedi N, Witte DR, Stevens LK, Porta M, Fuller J. Relationship between risk factors and mortality in type 1 diabetic patients in Europe: the EURODIAB Prospective Complications Study (PCS). *Diabetes Care*. 2008; 31:1360–6.
63. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, Burden AC, Morris A, Waugh NR, et al. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia* 2003;46:760–5.
64. Mameli C, Mazzantini S, Ben Nasr M, Fiorina P, Scaramuzza AE, Zuccotti GV. Explaining the increased mortality in type 1 diabetes. *World J Diabetes*. 2015;6:889–95.
65. Margeirsdottir HD, Stensaeth KH, Larsen JR, Brunborg C, Dahl-Jørgensen K. Early Signs of Atherosclerosis in Diabetic Children on Intensive Insulin Treatment: A population-based study. *Diabetes Care*. 2010; 33: 2043–8.
66. Schwab KO, Doerfer J, Hecker W, Grulich-Henn J, Wiemann D, Kordonouri O, et al. Spectrum and prevalence of atherogenic risk factors in 27,358 children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes: cross-sectional data from the German diabetes documentation and quality management system (DPV). *Diabetes Care*. 2006;29:218–25.
67. Järvisalo MJ, Putto-Laurila A, Jartti L, Lehtimäki T, Solakivi T, Rönnemaa T, et al. Carotid artery intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2002;51:493–8.
68. Järvisalo MJ, Raitakari M, Toikka JO, Putto-Laurila A, Rontu R, Laine S, et al. Endothelial dysfunction and increased arterial intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Circulation*. 2004;109:1750–5.
69. Larsen J, Brekke M, Sandvik L, Arnesen H, Hanssen KF, Dahl-Jørgensen K. Silent coronary atheromatosis in type 1 diabetic patients and its relation to long-term glycemic control. *Diabetes*. 2002;51:2637–41.
70. Joseph A, Ackerman D, Talley JD, Johnstone J, Kupersmith J. Manifestations of coronary atherosclerosis in young trauma victims--an autopsy study. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22:459–66.
71. McMahan CA, Gidding SS, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP, McGill HC. Pathobiological determinants of atherosclerosis in youth risk scores are associated with early and advanced atherosclerosis. *Pediatrics*. 2006;118:1447–55.
72. Schwab KO, Doerfer J, Marg W, Schober E, Holl RW. Characterization of 33488 children and adolescents with type 1 diabetes based on the gender-specific increase of cardiovascular risk factors. *Pediatr Diabetes*. 2010;11:357–63.
73. Margeirsdottir HD, Larsen JR, Brunborg C, Overby NC, Dahl-Jørgensen K. High prevalence of cardiovascular risk factors in children and adolescents with type 1 diabetes: a population-based study. *Diabetologia*. 2008;51:554–61.
74. Cooper MA, El-Osta A, Allen TJ, Watson AM, Thomas MC, Jandeleit-Dahm K. Metabolic Karma-The Atherogenic Legacy of Diabetes: The 2017 Edwin Bierman Award Lecture. *Diabetes*. 2018;67:785–9.
75. Wright E. Results of the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications. *Clin Diabetes*. 2015; 33: 144–5.

76. Nathan D, Bayless M, Cleary P, Genuth S, Gubitosi-Klug R, Lachin J, et al. Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study at 30 years. Advances and contributions. *Diabetes*. 2013;62:3976-86.
77. Fullerton B, Jeitler K, Seitz M, Horvath K, Berghold A, Siebenhofer A. Intensive glucose control versus conventional glucose control for type 1 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;(2):CD009122.
78. Reddy MA, Zhang E, Natarajan R. Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. *Diabetologia* 2015;58:443–55.
79. Snell Bergeon JK, Nadeau K. Cardiovascular disease risk in young people with type 1 diabetes. *J Cardiovasc Trans Res*. 2012; 5:446-62.
80. Baldi JC, Cassuto NA, Foxx-Lupo WT, Wheatley C, Snyder EM. Glycemic status affects cardiopulmonary exercise response in athletes with type I diabetes. *Med Sci Sports Exerc*. 2010; 42:1454–9.
81. Heilman K, Zilmer M, Zilmer K, Lintrop M, Kampus P, Kals J, et al. Arterial stiffness, carotid artery intima-media thickness and plasma myeloperoxidase level in children with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2009;84:168–73.
82. Rewers MJ, Pillay K, de Beaufort C, Craig ME, Hanas R, Acerini CL, Maahs MD. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014 Compendium: Assessment and monitoring of glycemic control in children and adolescents with diabetes. *Pediatr Diabetes* 2014;15: 102–14.
83. Guy J, Ogden L, Wadwa RP, Hamman RF, Mayer-Davis EJ, Liese AD, D'Agostino R , et al. Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth case-control study. *Diabetes Care*. 2009;32:416-20.
84. Maahs D, Maniatis AK, Nadeau K, Wadwa RP, McFann K, Klingensmith GJ. Total cholesterol and high-density lipoprotein levels in pediatric subjects with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr*. 2005;147:544–6.
85. Vergès B. Lipid disorders in type 1 diabetes. *Diabetes Metab*. 2009;35:353-60.
86. Berneis K, Rizzo M. The significance of small dense LDL. In Sukhinder C. Kaur. *Biochemistry of Atherosclerosis*. New York: Springer Science&Business Media; 2006. 170-4.
87. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res*. 2002;43:1363-79.
88. Rizzo M, Kotur-Stevuljevic J, Berneis K, Spinaz G, Rini GB, Jelic-Ivanovic Z, et al. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look. *Transl Res*. 2009;153:217-23.
89. Vergès B. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia*. 2015; 58:886–99.
90. Rodrigues TC, Biavatti K, Almeida FK, Gross JL. Coronary artery calcification is associated with insulin resistance index with patients with type 1 diabetes. *Braz J Med Biol Res* 2010; 43:1084-7.
91. Mottalib A, Kasetty M, Mar JY, Elseaidy T, Ashrafzadeh S, Hamdy O. Weight Management in Patients with Type 1 Diabetes and Obesity. *Curr Diab Rep*. 2017;17:92.
92. Asakawa A, Amitani H, Inui A. The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. *Front Neurosci*. 2013;7:51.
93. Krochik AG, Botto M, Hepner M, Frontroth JP, Miranda M et al. Association between insulin resistance and risk of complications in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Syndr*. 2015;9:14-8.
94. Williams KV, Erbey JR, Becker D, Arslanian S, Orchard TJ. Can clinical factors estimate insulin resistance in type 1 diabetes? *Diabetes*. 2000; 49: 626-32.
95. Danielson KK, Drum ML, Estrada CL, Lipton RB. Racial and ethnic differences in an estimated measure of insulin resistance among individuals with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2010; 33:614-9.

96. Nadeau KJ, Regensteiner JG, Bauer TA, Brown MS, Dorosz JL, Hull A. Insulin Resistance in Adolescents with Type 1 Diabetes and Its Relationship to Cardiovascular Function *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95: 513–21.
97. Camont L, Chapman MJ, Kontush A Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease *Trends. Mol Med.* 2011;17: 594-603.
98. Zhang Y, Zhu C, Xu R, Li S, Li X, Guo Y. HDL subfractions and very early CAD: novel findings from untreated patients in a Chinese cohort. *Sci Rep.* 2016; 6: 30741.
99. Asztalos BF, Horvath KV, Schaefer EJ. High-density lipoprotein particles, cell-cholesterol efflux, and coronary heart disease risk. *Thromb Vasc Biol.* 2018; 38:2007-15.
100. Ragbir S, Farmer JA. Dysfunctional high-density lipoprotein and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2010;12:343-8.
101. Serban C, Muntean D, Mikhailids DP, Toth P, Banach M. Disfunctional HDL: the journey from savior to slayer. *J Clin Lipidol.* 2014;9:49-59.
102. Colhoun HM, Scheek LM, Rubens MB, Van Gent T, Underwood SR, Fuller JH et al. Lipid transfer protein activities in type 1 diabetic patients without renal failure and nondiabetic control subjects and their association with coronary artery calcification. *Diabetes;* 2001; 50: 652-9.
103. Tsugikazu K. *The HDL Handbook. Biological function and clinical implications.* London: Academic Press; 2014. 320 p.
104. Bagdade JD, Subbiah PV. Whole-plasma and high-density lipoprotein subfraction surface lipid composition in IDDM men. *Diabetes.* 1989; 38: 1226-30.
105. Brites F, Martin M, Guillas I, Kontush A. Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit. *BBA Clin.* 2017; 8: 66–77.
106. Huang Y , Wu Z, Riwanto M, Gao S, Levison BS, Gu X. Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and HDL form a functional ternary complex. *J Clin Invest.* 2013; 123: 3815–28.
107. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman A. Antiinflammatory Properties of HDL. *Circ Res.* 2004; 95:764-72.
108. Gruaz L, Delucinge-Vivier C, Descombes P, Dayer JM, Burger D. Blockade of T cell contact-activation of human monocytes by high-density lipoproteins reveals a new pattern of cytokine and inflammatory genes. *PLoS One.* 2010; 5:e9418.
109. Cabana VG, Reardon CA, Feng N, Neath S, Lukens J, Getz GS. Serum paraoxonase: effect of the apolipoprotein composition of HDL and the acute phase response. *J Lipid Res* 2003;44:780-92.
110. Birner-Gruenberger R, Schittmayer M, Holzer M, Marsche G. Understanding high-density lipoprotein function in disease: recent advances in proteomics unravel the complexity of its composition and biology. *Prog Lipid Res.* 2014; 56:36-46.
111. McEneny J, Daniels JA, McGowan A, Gunness A Moore K, Stevenson M, et al. A cross-sectional study demonstrating increased serum amyloid a related inflammation in high-density lipoproteins from subjects with type 1 diabetes mellitus and how this association was augmented by poor glycaemic control. *J Diabetes Res.* 2015; 2015:351601.
112. Chiba T, Chang MY, Wang S. Serum amyloid A facilitates the binding of high-density lipoprotein from mice injected with lipopolysaccharide to vascular proteoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31:1326–32.
113. Fruchart JC, Nierman MC, Stroes E, Kastelein J, Duriez P. New Risk Factors for Atherosclerosis and Patient Risk Assessment. *Circulation.* 2004;109:15-19.
114. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, et al. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2004;291:1071–80.
115. Jeon H, Blacklow SC. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:535-62.

116. Rudenko G, Henry L, Henderson K, Ichtchenko K, Brown MS, Goldstein JL, et al. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science*. 2002;298:2353-8.
117. Lo Surdo P, Bottomley MJ, Calzetta A, Settembre EC, Cirillo A, Pandit S, et al. Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH. *EMBO Rep*. 2011;12:1300-5.
118. Arias-Moreno X, Velazquez-Campoy A, Rodríguez JC, Pocoví M, Sancho J. Mechanism of low density lipoprotein (LDL) release in the endosome: implications of the stability and Ca²⁺ affinity of the fifth binding module of the LDL receptor. *J Biol Chem*. 2008; 283:22670-9.
119. Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*. 1990; 265:3116-23.
120. He G, Gupta S, Yi M, Michaely P, Hobbs H, Cohen J. ARH is a modular adaptor protein that interacts with the LDL receptor, clathrin, and AP-2. *J Biol Chem* 2002; 46: 44044 –9.
121. Yeagle P. *The membrane of cells*. New York:Academic press. 2016: 401-425p.
122. Huang S, Henry L, Ho YK, Pownall HJ, Rudenko G. Mechanism of LDL binding and release probed by structure-based mutagenesis of the LDL receptor. *J Lipid Res* 2010; 51:297–308.
123. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003;34:154–6.
124. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH Jr, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2006; 354:1264-72.
125. Cariou B, Ouguerram K, Zaïr Y, Guerois R, Langhi C, Kourimate S, et al. PCSK9 dominant negative mutant results in increased LDL catabolic rate and familial hypobetalipoproteinemia *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:2191-7.
126. Dadu RT, Ballantyne CM. Lipid lowering with PCSK9 inhibitors. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11: 563–75.
127. Banerjee Y, Santos RD, Al-Rasadi K, Rizzo M. Targeting PCSK9 for therapeutic gains: Have we addressed all the concerns? *Atherosclerosis*. 2016; 248: 62-75.
128. Schultz R, Schlüter KD, Laufs U. Molecular and cellular function of the proprotein convertase subtilin/kexin type 9. *Basic Res Cardiol*. 2015; 110:4.
129. Maxwell KN, Fisher EA, Breslow JL. Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;1022069-74.
130. Lagace TA. PCSK9 and LDLR degradation: regulatory mechanisms in circulation and in cells. *Curr Opin Lipidol*. 2014; 25:387-93.
131. Fan D, Yancey PG, Qiu S, Ding L, Weeber EJ, Linton MF, Fazio S. Self-association of human PCSK9 correlates with its LDLR-degrading activity. *Biochemistry*. 2008;47:1631-9.
132. Tavori H, Rashid S, Fazio S. On the function and homeostasis of PCSK9: reciprocal interaction with LDLR and additional lipid effects. *Atherosclerosis*. 2015;238:264-70.
133. Benjannet S, Rhainds D, Hamelin J, Nassoury N, Seidah NG. The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *J Biol Chem*. 2006;281:30561-72.
134. Norata GD, Tavori H, Pirillo A, Fazio S, Catapano AL. Biology of proprotein convertase subtilisin kexin 9: Beyond low-density lipoprotein cholesterol lowering. *Cardiovasc Res*. 2016;112:429-42.
135. Kosenko T, Golder M, Leblond G, Weng W, Lagace TA. Low density lipoprotein binds to proprotein convertase subtilisin/kexin type-9 (PCSK9) in human plasma and inhibits

- PCSK9-mediated low density lipoprotein receptor degradation. *J Biol Chem.* 2013; 288:8279-88.
136. Tavori H, Giunzioni I, Linton MF, Fazio S. Loss of plasma proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) after lipoprotein apheresis. *Circ Res.* 2013; 113:1290-5.
 137. Sun H, Samarghandi A, Zhang N, Yao Z, Xiong M, Teng BB. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 interacts with apolipoprotein B and prevents its intracellular degradation, irrespective of the low-density lipoprotein receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:1585-95.
 138. Roubtsova A, Munkonda MN, Awan Z, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Lazure C, Cianflone K, Seidah NG, Prat A. Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates VLDLR protein and triglyceride accumulation in visceral adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31:785-91.
 139. Canuel M, Sun X, Asselin MC, Paramithiotis E, Prat A, Seidah NG. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) can mediate degradation of the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1). *PLoS One.* 2013;8(5):e64145.
 140. Gagnon A, Ooi TC, Cousins M, Favreau C, Henry K, Landry A, et al. The anti-adipogenic effect of peripheral blood mononuclear cells is absent with PCSK9 loss-of-function variants. *Obesity.* 2016;24:2384-91.
 141. Baass A, Dubuc G, Tremblay M, Delvin EE, O'Loughlin J, et al. Plasma PCSK9 is associated with age, sex, and multiple metabolic markers in a population-based sample of children and adolescents. *Clin Chem.* 2009; 55:1637-45.
 142. Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94: 2537-43.
 143. Laugier Robiollé S, Verges B, Le Bras M, Gand E, Bouillet B, Saulnier PJ et al. Glycaemic control influences the relationship between plasma PCSK9 and LDL cholesterol in type 1 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2017;19:448-51.
 144. Brouwers MC, Troutt JS, van Greevenbroek MM, Ferreira I, Feskens EJ, van der Kallen CJ, et al. Plasma proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is not altered in subjects with impaired glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus, but its relationship with non-HDL cholesterol and apolipoprotein B may be modified by type 2 diabetes mellitus: The CODAM study. *Atherosclerosis.* 2011; 217: 263-67.
 145. Morena M, Le May C, Chenine L, Arnaud L, Dupuy AM, Pichelin M, et al. Plasma PCSK9 concentrations during the course of nondiabetic chronic kidney disease: relationship with glomerular filtration rate and lipid metabolism. *J Clin Lipidol.* 2017; 11: 87-93.
 146. Brouwers MC, van Greevenbroek MM, Konrad RJ, Troutt JS, Schaper NC, Stehouwer CD. Circulating PCSK9 is a strong determinant of plasma triacylglycerols and total cholesterol in homozygous carriers of apolipoprotein ε2. *Clin Sci.* 2014; 126: 679-84.
 147. Warden BA, Fazio S, Shapiro MD. The PCSK9 revolution: Current status, controversies, and future directions. *Trends Cardiovasc Med.* 2019; S1050-1738(19)30072-6.
 148. Filippatos D, Kei A, Rizos CV, Elisaf MS. Effects of PCSK9 inhibitors on other than low-density lipoprotein cholesterol lipid variables. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2018;23: 3-12.
 149. Rashid S, Tavori H, Brown PE, Linton MF, He J, Giunzioni I, Fazio S. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 promotes intestinal overproduction of triglyceride-rich apolipoprotein B lipoproteins through both low-density lipoprotein receptor-dependent and-independent mechanisms *Circulation* 2014;130: 431-41.
 150. Chan DC, Wong AT, Pang J, Barrett PH, Watts GF. Interrelationships between proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, apolipoprotein C-III and plasma apolipoprotein B-48 transport in obese subjects: a stable isotope study in the postprandial state. *Clin Sci* 2015;128:379-385.

151. Zhang Y, Xu RX, Li S, Zhu CG, Guo Yj, Li JJ. Association of plasma small dense LDL cholesterol with PCSK9 levels in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2015;25: 426-433.
152. Kjellmo CA, Hovland A, Lappegård A. CVD Risk Stratification in the PCSK9 Era: Is there a role for LDL subfractions? *Diseases.* 2018;6:45.
153. Ferri N, Corsini A, Macchi C, Magni P, Ruscica M. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 and high-density lipoprotein metabolism: experimental animal models and clinical evidence. *Transl Res.* 2016 ;173:19-29.
154. Abifadel M, Guerin M, Benjaneet JP, Rabès JP, Le Goff W, Julia Z, et al. Identification and characterisation of new gain-of-function mutation in the PCSK9 gene responsible for autosomal dominant hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2012; 223:394-400.
155. Choi S, Korstanje R. Proprotein convertases in high-density lipoprotein metabolism. *Biomark Res.* 2013; 1: 27.
156. Koren MJ, Kereiakes D, Pourfarzib R, Winegar D, Banerjee P, Hamon S. Effect of alirocumab on lipoprotein particle concentrations determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Am Heart Assoc.* 2015; 4 (11).
157. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002;109:1125-31
158. Browning JD, Horton JD. Fasting reduces plasma proprotein convertase, subtilisin/kexin type 9 and cholesterol biosynthesis in humans. *J Lipid Res.* 2010;51:3359-63.
159. Costet P, Cariou B, Lambert G, Lalanne F, Lardeux B, Jarnoux AL, et al. Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J Biol Chem.* 2006;281:6211-8.
160. Shende VR, Wu M, Singh AB, Dong B, Kan CF, Liu J. Reduction of circulating PCSK9 and LDL-C levels by liver-specific knockdown of HNF1 α in normolipidemic mice. *J Lipid Res.* 2015;56:801-9.
161. Azzout-Marniche D, Bécard D, Guichard C, Foretz M, Ferré P, Foufelle F. Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem J.* 2000; 350:389-93.
162. Ai D, Baez JM, Jiang H, Conlon DM, Hernandez-Ono A, Frank-Kamenetsky M, et al. Activation of ER stress and mTORC1 suppresses hepatic sortilin-1 levels in obese mice. *J Clin Invest.* 2012;122:1677-87.
163. Miao J, Manthena PV, Haas ME, Ling AV, Shin DJ, Graham MJ, et al. Role of Insulin in the Regulation of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 ;35:1589-96.
164. Kappelle PJ, Lambert G, Dullaart RP. Atherosclerosis. Plasma proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 does not change during 24h insulin infusion in healthy subjects and type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis.* 2011;214:432-5.
165. Awan Z, Dubuc G, Faraj M, Dufour R, Seidah NG, Davignon J et al. The effect of insulin on circulating PCSK9 in postmenopausal obese women. *Clin Biochem.* 2014;47:1033-9.
166. Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell.* 2000;6:77-86.
167. Niesen M, Bedi M, Lopez D. Diabetes alters LDL receptor and PCSK9 expression in rat liver. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 470:111–5.
168. Levenson AE, Shah A, Khoury P, Kimball T, Urbina E, de Ferranti S, et al. Obesity and Type 2 diabetes are associated with elevated PCSK9 levels in young women. *Pediatr Diabetes.* 2017; 18:755-60.
169. Langhi C, Le May C, Gmyr V, Vandewalle B, Kerr-Conte J, Krempf M, Pattou F, et al. PCSK9 is expressed in pancreatic delta-cells and does not alter insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 390: 1288-93.

170. Bonnefond A, Yengo L, Le May C, Fumeron F, Marre M, Balkau B, Charpentier G, Franc S, Froguel P, Cariou B. The loss-of-function PCSK9 p.R46L genetic variant does not alter glucose homeostasis. *Diabetologia*. 2015;58:2051–2055.
171. Saavedra YG, Dufour R, Baass A. Familial hypercholesterolemia: PCSK9 InsLEU genetic variant and prediabetes/diabetes risk. *J Clin Lipidol*. 2015;9:786–793.
172. Ferri N, Tibolla G, Pirillo A, Cipollone F, Mezzetti A, Pacia S, et al. Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 (PCSK9) Secreted by Cultured Smooth Muscle Cells Reduces Macrophages LDLR Levels. *Atherosclerosis*. 2012; 220: 381-6.
173. Schluter KD, Wolf A, Weber M, Schreckenber R, Rainer Schulz R. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) affects load-free cell shortening of cardiomyocytes in a proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9)-dependent way. *Basic Res Cardiol*. 2017: 112:63.
174. Ding Z, Liu S, Wang X, Deng X, Fan Y, Sun C, et al. Hemodynamic shear stress via ROS modulates PCSK9 expression in human vascular endothelial and smooth muscle cells and along the mouse aorta. *Antiox Redox Signal* 2015; 22: 760–71.
175. Chen M, Masaki T, Sawamura T. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther*. 2002; 95:89-100.
176. Giunzioni I, Tavori H, Covarrubias R, Major AS, Ding L, Zhang Y, et al. Local effects of human PCSK9 on the atherosclerotic lesion. *J Pathol*. 2016; 238:52–62.
177. Tang Z, Jiang L, Peng J, Ren Z, Wei D, Wu C, Pan L, Jiang Z, Liu L. PCSK9 siRNA suppresses the inflammatory response induced by oxLDL through inhibition of NF-kappaB activation in THP-1-derived macrophages. *Int J Mol Med* 2012;30:931–38.
178. Alborn WE, Cao G, Careskey HE, Qian YW, Subramaniam DR, Davies J, Conner EM, Konrad RJ Serum proprotein convertase subtilisin kexin type 9 is correlated directly with serum LDL cholesterol. *Clin Chem*. 2007; 53:1814-19.
179. Levenson AE, Wadwa PR, Shah AS, Khoury PR, Kimball TR, Urbina EM. PCSK9 is increased in youth with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2017; 40: e85–e87.
180. Schmidt AF, Swerdlow DI, Holmes MV, Patel RS, Fairhurst-Hunter Z, Lyall DM et al. PCSK9 genetic variants and risk of type 2 diabetes: a mendelian randomisation study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5:97-105.
181. Ferri N, Ruscica M. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and metabolic syndrome: insights on insulin resistance, inflammation, and atherogenic dyslipidemia. *Endocrine*. 2016;54:588-601.
182. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Eng J Med* 2005; 352:1685-95.
183. Forbes JM, Söderlund J, Yap FY, Knip M, Andrikopoulos S, Ilonen J, et al. Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) provides a link between genetic susceptibility and environmental factors in type 1 diabetes. *Diabetologia* 2011;54:1032-42.
184. Leung SS, Forbes JM, Borg DJ. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) in Type 1 Diabetes Pathogenesis. *Curr Diabet Rep*. 2016;16:100.
185. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Receptor for AGE (RAGE) and its ligands—cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response. *J Mol Med* 2009; 87:235-47.
186. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J*. 2003;370:1097-109.
187. Hudson BI, Carter AM, Harja E, Kalea AZ, Arriero M, Yang H, et al. Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J*. 2008;22:1572-8.
188. Yonekura, Pullerits R, Brisslert M, Jonsson IM, Tarkowski A. Soluble receptor for advanced glycation end products triggers a proinflammatory cytokine cascade via beta2 integrin Mac-1. *Arthritis Rheum*. 2006;54:3898-907.

189. Averill MM, Kerkhoff C, Bornfeldt KE. S100A8 and S100A9 in cardiovascular biology and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:223-9.
190. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature.* 2000; 405:354-60.
191. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 2002; 418:191-5.
192. Inoue K, Kawahara K, Biswas KK, Ando K, Mitsudo K, Nobuyoshi M, et al. HMGB1 expression by activated vascular smooth muscle cells in advanced human atherosclerosis plaques. *Cardiovasc Pathol.* 2007; 16:136-43.
193. Beyan H, Riese H, Hawa MI, Beretta G, Davidson HW, Hutton J, et al. Glycotoxin and autoantibodies are additive environmentally determined predictors of type 1 diabetes. *Diabetes.* 2012;61:1191-8.
194. Han XQ, Gong ZJ, Xu SQ, Li X, Wang LK, Wu SM et al. Advanced glycation end products promote differentiation of CD4(+) T helper cells toward pro-inflammatory response. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2014;34:10-1.
195. Reis S. Dendritic cells in mature age. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:476-83.
196. Wild CA, Bergmann C, Fritz G, Schuler P, Hoffmann T, Lofti R, et al. HMGB1 conveys immunosuppressive characteristics on regulatory and conventional T cells. *Int Immunol.* 2012; 24: 485-94.
197. Rojas A, Delgado-López F, Perez-Castro R, Gonzales I, Romero J, Rojas I, et al. HMGB1 enhances the protumoral activities of M2 macrophages by a RAGE-dependent mechanism. *Tumor Biol.* 2016; 37: 3321-9.
198. Kang R, Chen R, Xie M, Lizhi Cao L, Lotze MT, Tang D, et al. The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) activates the AIM2 inflammasome in acute pancreatitis. *J Immunol.* 2016; 196:4331-7.
199. Gouda W, Mageed L, Abd El Dayem S, Ashour E, Afifi M. Evaluation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in type 1 diabetes mellitus. *Bull Natl Res Cent.* 2018; 42:14.
200. Savinov AY, Rozanov DV, Strongin AY. Specific inhibition of autoimmune T cell transmigration contributes to beta cell functionality and insulin synthesis in non-obese diabetic (NOD) mice. *J Biol Chem.* 2007; 282:32106-11.
201. Basta G, Lazzarini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, et al. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation.* 2002;105:816-22.
202. Zhu Y, Shu T, Lin Y, Wang H, Yang J, Shi Y, et al. Inhibition of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) protects pancreatic β -cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;404:159-65.
203. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Advanced glycation endproducts: from precursors to RAGE: round and round we go. *Amino Acids.* 2012 ;42:1151-61.
204. Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. The RAGE connection to diabetes and atherosclerosis: An intertwined web of advanced glycation and inflammation. *Future Lipidol.* 2007; 2: 239-50.
205. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 2000;342:1350-8.
206. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGF β activation. *J Cell Sci.* 2003;116:217-24.
207. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003;113:685-700.
208. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 2003;425:577-84.

209. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24:99–146.
210. Travis MA, Shepard D. TGF- β activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:51-82.
211. Ouyang W, Beckett O, Ma Q, Li MO. Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity.* 2010;32:642-53.
212. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:253-7.
213. Sanjabi S, Oh SA, Li MO. Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9:a022236.
214. Peng Y, Laoua Y, Li MO, Green A, Flavell RA. TGF- β regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 4572–7.
215. Singh B, Krawetz MD, Lima R, Mukherjee R, Chaturvedi P, Lee-Chan E, et al. Role of TGF- β in self-peptide regulation of autoimmunity. *Arch Immunol,* 2018;66:11-19.
216. Grande JP. Mechanisms of progression of renal damage in lupus nephritis: pathogenesis of renal scarring. *Lupus* 1998;7:604–10.
217. Saxena V, Lienesch DW, Zhou M, Bommireddy R, Azhar M, Doetschman T, et al. Dual roles of immunoregulatory cytokine TGF-beta in the pathogenesis of autoimmunity-mediated organ damage. *J Immunol.* 2008;180:1903-12.
218. Hinz B. The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biol.* 2015;47:54-65.
219. Redondo S, Navarro-Dorado J, Ramajo M, Medina U, Tejerina T. The complex regulation of TGF- β in cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag.* 2012; 8:533–9.
220. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.* 2007;115:1285-95.
221. Gamble JR, Khew-Goodall Y, Vadas MA. Transforming growth factor-beta inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. *J Immunol.* 1993; 150: 4494-503.
222. Argmann CA, Van Den Diepstraten C, Sawyez C, Edwards J, Hegele R, Wolfe B, et al. Transforming growth factor- β 1 inhibits macrophage cholesterol ester accumulation induced by native and oxidized VLDL remnants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:2011-8.
223. Grainger DJ. Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:399-404.
224. Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118:692-702.
225. Feinberg MW, Watanabe M, Lebedeva MA, Depina AS, Hanai J, Mammoto T, et al. Transforming growth factor-beta1 inhibition of vascular smooth muscle cell activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem.* 2004;279:16388-93.
226. Toma I, McCaffrey T. Transforming growth factor- β and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects. *Cell Tissue Res.* 347:155-175.
227. Otsuka G, Agah R, Frutkin AD, Wight TN, Dichek DA. Transforming growth factor beta 1 induces neointima formation through plasminogen activator inhibitor-1-dependent pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:737-43.
228. McCaffrey T. TGF- β signaling in atherosclerosis and restenosis. *Front Biosci.* 2009; 1:236-45.
229. Bollineni JS, Reddi AS. Transforming growth factor-beta 1 enhances glomerular collagen synthesis in diabetic rats. *Diabetes.* 1993;42:1673-7.
230. Sharma K, McGowan. TGF-beta in diabetic kidney disease: role of novel signaling pathways. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000: 115-23.

231. Goumenos D, Tsakas S, El Nahas A, Alexandri S, Oldroyd S, Kalliakmani P, et al. Transforming growth factor- β 1 in the kidney and urine of patients with glomerular disease and proteinuria. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17: 2145–152.
232. Zorena K, Raczyńska D, Wiśniewski P, Malinowska E, Myśliwiec M, Raczyńska K, et al. Relationship between Serum Transforming Growth Factor β 1 Concentrations and the Duration of Type 1 Diabetes Mellitus in Children and Adolescents. *Mediators Inflamm*. 2013;2013: 849457.
233. Jakuš V, Sapák M, Kostolanská J. Circulating TGF- β 1, glycation, and oxidation in children with diabetes mellitus type 1. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:510902.
234. Chang AS, Hathaway CK, Smithies O, Kakoki M. Transforming growth factor- β 1 and diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;310:F689-F696.
235. Maftai O, Pena AS, Sullivan T, Jones TW, Donaghue KC, Cameron FJ, et al. Early atherosclerosis relates to urinary albumin excretion and cardiovascular risk factors in adolescents with type 1 diabetes: adolescent type 1 diabetes cardio-renal intervention trial (AddIT). *Diabetes Care*. 2014; 37:3069-75.
236. De Zeeuw D, Parvin HH, Henning RH. Microalbuminuria as an early marker for cardiovascular disease. *J Am Soc Nephrol*. 17:2100-5.
237. Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen T, Kofoed-Enevoldsen. Albuminuria reflects widespread vascular damage. The Steno hypothesis. *Diabetologia*. 1989;32:219-26.
238. Stenhowe CDA, Smulders YM. Microalbuminuria and risk for cardiovascular disease: Analysis of potential mechanisms. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:2106-11.
239. Schultz CJ, Neil HA, Dalton RN, Dunger DB; Oxford Regional Prospective Study Group. Risk of nephropathy can be detected before the onset of microalbuminuria during the early years after diagnosis of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2000;23:1811–1815.
240. Stone ML, Craig ME, Chan AK, Lee JW, Verge CF, Donaghue KC. Natural history and risk factors for microalbuminuria in adolescents with type 1 diabetes: a longitudinal study. *Diabetes Care*. 2006; 29: 2072-7.
241. Abouy Raya A, Abouy Raya S. Inflammation: A pivotal link between autoimmune diseases and atherosclerosis. *Autoimmun Rev*. 2006;5:331-7.
242. Mahmud FH, Elbarbary NS, Fröhlich-Reiterer E, Holl RW, Kordonouri O, Knip M, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Other complications and associated conditions in children and adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2018; 19:275–86.
243. Kakleas K, Paschali E, Kefalas N, Fotinou A, Kanariou M, Karayianni C, Karavanaki K. Factors for thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Ups J Med Sci*. 2009; 114: 214–20.
244. Bratanic N, Smigoc Schweiger D, Mendez A, Bratina N, Battelino T, Vidan-Jeras B. An influence of HLA-A, B, DR, DQ, and MICA on the occurrence of Celiac disease in patients with type 1 diabetes. *Tissue Antigens*. 2010;76:208-15.
245. Shun CB, Donaghue KC, Phelan H, Twigg SM, Craig ME. Thyroid autoimmunity in type 1 diabetes: systematic review and meta-analysis. *Diabet Med*. 2014;31:126-35.
246. Kordonouri O, Hartmann R, Deiss D, Wilms M, Gruters-Kieslich A. Natural course of autoimmune thyroiditis in type 1 diabetes: association with gender, age, diabetes duration, and puberty. *Arch Dis Child*. 2005;90:411-14.
247. Brown R. Autoimmune thyroiditis in childhood. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2013; 5:45–9.
248. Duntas LH, Brenta G. A renewed focus on the association between thyroid hormones and lipid metabolism. *Front Endocrinol*. 2018; 9:51.
249. Denzer C, Karges B, Nake A, Rosenbauer J, Schober E, Schwab OK, et al. Subclinical hypothyroidism and dyslipidemia in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*. 2013; 168:601-8.

250. Cerbone M, Capalbo D, Wasniewska M, Mattace Raso G, Alfano S, Meli R, et al. Cardiovascular risk factors in children with long-standing untreated idiopathic subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99:2697-703.
251. Brenta G, Fretes O. Dyslipidemias and hypothyroidism. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2014;11:390-9.
252. Kordonouri O, Albrecht Klinghammer, A, Lang E, Grüters-Kieslich A, Grabert M, Holl R, et al. Thyroid Autoimmunity in Children and Adolescents With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care.* 2002; 25: 1346-50.
253. Camarca ME, Mozzillo E, Nugnes R, Zito E, Falco M, Valentina Fattorusso, et al. Celiac disease in type 1 diabetes mellitus. *Ital J Pediatr.* 2012,38:10.
254. Warncke K, Liptay S, Fröhlich-Reiterer E, Scheuing N, Schebek M, Wolf J, et al. Vascular risk factors in children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes complicated by celiac disease: results from the DPV initiative. *Pediatr Diabetes.* 2016;17:191-8.
255. De Marchi S, Chiarioni G, Prior M, Arosio E. Young adults with coeliac disease may be at increased risk of early atherosclerosis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013;38:162-9.
256. Pham-Short A, C Donaghue K, Ambler G, K Chan A, Hing S, Cusumano J, E Craig M. Early elevation of albumin excretion rate is associated with poor gluten-free diet adherence in young people with coeliac disease and diabetes. *Diabet Med.* 2014;31:208-12.
257. Pitocco D, Giubilato S, Martini F, Zaccardi F, Pazzano V, Manto A, et al. Combined atherogenic effects of celiac disease and type 1 diabetes mellitus. *Atherosclerosis.* 2011;217:531-5.
258. Craig ME, Jefferies C, Dabelea D, Balde N, Seth A, Donaghue KC. Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes.* 2014;15: 4–17.
259. Kordonouri O, Klingensmith G, Knip M, Holl RW, Menon PSN, Aanstoot HJ, Craig ME. Other complications and diabetes-associated conditions in children and adolescents. *Pediatr Diabetes.* 2014; 15: 270–8.
260. Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ Translating the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care* 2008;31:1473-8.
261. Schwartz GJ, Munoz A, Schneider MF, Mak RH, Kaskel F, Warady BAFS. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol.*2009;20:629-37.
262. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics.*2004;114:555-76.
263. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child.* 1970;45: 13-23.
264. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child.*1969; 44: 291-303.
265. Barlow SE. Expert committee recommendations regarding the prevention, assessment, and treatment of child and adolescent overweight and obesity: summary report. *Pediatrics.* 2007;120:S164-S192.
266. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje lipidskih poremećaja. Beograd: Agencija za akreditaciju zdravstvenih ustanova Srbije; 2012.
267. Rainwater DL. Electrophoretic separation of LDL and HDL subclasses. *Methods Mol Biol.* 1998;110:137-151.
268. Rainwater DL, Moore PH, Shelledy WR, Dyer TD. Characterization of a composite gradient gel for the electrophoretic separation of lipoproteins. *J Lipid Res.* 1997;38:1261-1266.

269. Vujovic A, Spasojevic-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojevic N, Spasic S, Kotur-Stevuljevic J, Jelić-Ivanović Z. Comparison of two RNA isolation methods for determination of SOD1 and SOD2 gene expression in human blood and mononuclear cells. *Indian J Biotechnol.* 2013;12:468-74.
270. High Capacity DNA Reverse Transcription Kit [Internet]. Foster City: Applied Biosystems; c2019 [cited 2019 Nov 1]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4368814?ICID=search-product#/4368814?ICID=search>
271. Relative Quantification Getting Started Guide for the Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System [Internet]. Foster City: Applied Biosystems. c2019 [cited 2019 Nov 1]. Available from: <https://cloudfront.ualberta.ca/-/media/science/departments/biological-sciences/mbsu/abi-qrt-pcr/relative-quantificationgetting-started.pdf>
272. Hermann R, Knip M, Veijola R, Simell O, Laine AP, Akerblom HK, et al. Temporal changes in the frequencies of HLA genotypes in patients with type 1 diabetes indication of an increased environmental pressure? *Diabetologia.* 2003;46:420-425.
273. Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Research Group. Risk factors for cardiovascular disease in type 1 diabetes. *Diabetes* 2016;65:1370–9.
274. Pambianco G, Costacou T, Ellis D, Becker DJ, Klein R, Orchard TJ. Diabetes. The 30-year natural history of type 1 diabetes complications: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience. 2006;55:1463-9.
275. Miller RG, Costacou T, Orchard TJ. Risk Factor Modeling for Cardiovascular Disease in Type 1 Diabetes in the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications (EDC) Study: A Comparison With the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study (DCCT/EDIC). *Diabetes.* 2019;68:409-19.
276. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP 3rd, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med.* 1998;338:1650-6.
277. Edge JA, James T, Shine B. Longitudinal screening of serum lipids in children and adolescents with Type 1 diabetes in a UK clinic population. *Diabet Med.* 2008;25:942-8.
278. Brink S, Moltz K. The message of the DCCT for children and adolescents. *Diabetes Spectrum.* 1997; 4: 259-67.
279. Paris CA, Imperatore G, Klingensmith G, Petitti D, Rodriguez B, Anderson AM et al. Predictors of insulin regimens and impact on outcomes in youth with type 1 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth study. *J Pediatr* 2009;155:183–9.
280. Maahs DM, Wadwa RP, McFann K, Nadeau K, Williams MR, Eckel RH, et al. Longitudinal lipid screening and use of lipid lowering medications in pediatric type 1 diabetes. *J Pediatr.* 2007;150:146-50.
281. Kahri J, Groop PH, Viberti G, Elliott T, Taskinen MR. Regulation of apolipoprotein-A-I-containing lipoproteins in IDDM. *Diabetes.* 1993;42:1281-8.
282. Hayashibe H, Asayama K, Nakane T, Kobayashi K, Amemiya S, Nakazawa S. Decreased activity of plasma cholesteryl ester transfer protein in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Paediatr.* 1999;88: 1067–70.
283. NCEP Expert Panel on Blood Cholesterol: Levels in children and adolescents: National Cholesterol Education Program (NCEP): highlights of the Report of the Expert Panel on Blood Cholesterol Levels in Children and Adolescents. *Pediatrics.* 1992; 89:495–501.
284. American Diabetes Association. Management of dyslipidemia in children and adolescents with diabetes. *Diabetes Care.* 2003; 29:14-7.

285. Feitosa A, Feitosa-Filho G, F, Wajchenberg BL, Maranhão RC. Lipoprotein metabolism in patients with type 1 diabetes under intensive insulin treatment. *Lipids Health Dis.* 2013; 12:15.
286. Zhang Y, Jenkins AJ, Basu A, Stoner JA, Lopes-Virella MF, Klein RL. Associations between intensive diabetes therapy and NMR-determined lipoprotein subclass profiles in type 1 diabetes *J Lipid Res.*2016;57:310-7.
287. Soedamah-Muthu SS, Chang YF, Otvos J, Evans RW, Orchard TJ. Lipoprotein subclass measurements by nuclear magnetic resonance spectroscopy improve the prediction of coronary artery disease in Type 1 diabetes. A prospective report from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetologia.* 2003;46:674-82.
288. Krauss RM. Lipoprotein subfractions and cardiovascular disease risk. *Curr Opin Lipidol.*2010;21:305-11.
289. Norata GD, Raselli S, Grigore L, Garlaschelli K, Vianello D, Bertocco S, et al. Small dense LDL and VLDL predict common carotid artery IMT and elicit an inflammatory response in peripheral blood mononuclear and endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2009;206:556-62.
290. Hoogeveen RC, Gaubatz JW, Sun W, Dodge RC, Crosby JR, Jiang J, et al. Small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:1069-77.
291. Mora S, Otvos JD, Rifai N, Rosenson RS, Buring JE, Ridker PM. Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apolipoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women. *Circulation.* 2009;119:931-9.
292. Mora S, Szklo M, Otvos JD, Greenland P, Psaty BM, Goff DC Jr, et al. LDL particle subclasses, LDL particle size, and carotid atherosclerosis in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis.* 2007;192:211-7.
293. Ip S, Lichtenstein AH, Chung M, Lau J, Balk EM. Systematic review: association of low-density lipoprotein subfractions with cardiovascular outcomes. *Ann Intern Med.* 2009;150:474-84.
294. Alabakovska SB, Labudovic DD, Tosheska KN, Spiroski MZ, Todorova BB. Low density lipoprotein subclass distribution in children with diabetes mellitus. *Bratis Lek Listy.*2008; 109:155-9.
295. Gallo LM, Silverstein JH, Shuster JJ, Haller MJ. Arterial stiffness, lipoprotein particle size, and lipoprotein particle concentration in children with type 1 diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2010;23:661-7.
296. Gourgari E, Playford MP, Campia U, Dey AK, Cogen F, Gubb-Weiser S, et al. Low cholesterol efflux capacity and abnormal lipoprotein particles in youth with type 1 diabetes: a case control study. *Cardiovasc Diabetol.* 2018;17:158.
297. Cali A, Zern T, Taksali S, de Oliveira AM, Dufour S, Otvos JD, Caprio S. Intrahepatic Fat Accumulation and Alterations in Lipoprotein Composition in Obese Adolescents. *Diabetes Care.* 2007; 30: 3093-8.
298. Hanks L, Pelham JH, S Vaid S, Casazza K, Ashraf AP. Overweight adolescents with type 2 diabetes have significantly higher lipoprotein abnormalities than those with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2016; 115: 83–89.
299. Diffenderfer MR, Schaefer EJ. The composition and metabolism of large and small LDL. *Curr Opin Lipidol.* 2014;25:221-6.
300. Thongtang N, Diffenderfer MR, Ooi EMM, Barrett PHR, Turner SM, Le NA, et al. Metabolism and proteomics of large and small dense LDL in combined hyperlipidemia: effects of rosuvastatin. *J Lipid Res.* 2017;58:1315-24.
301. Larrede S, Quinn CM, Jessup W, Frisdal E, Olivier M, Hsieh V, et al. Stimulation of cholesterol efflux by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages is ABCA1-dependent but ABCG1-independent. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1930–6.

302. Du XM, Kim MJ, Hou L, Le Goff W, Chapman MJ, Van Eck M, et al. HDL Particle Size Is a Critical Determinant of ABCA1-Mediated Macrophage Cellular Cholesterol Export. *Circulation Research*. 2015; 116:1133–142.
303. Heier M, Borja MS, Brunborg C, Seljeflot I, Margeirsdottir HD, et al. Reduced HDL function in children and young adults with type 1 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*.2017; 16:85.
304. Norata GD, Pirillo A, Catapano AL. Modified HDL:biological and physiopathological consequences. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006; 16:371–86.
305. Farbstein D, Levy PA. HDL dysfunction in diabetes: causes and possible treatments. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2012;10 :353–61.
306. Zeljkovic A, Vekic J, Spasojevic-Kalimanovska V, Jelic-Ivanovic Z, Bogavac-Stanojevic N, Gulan B, Spasic S. LDL and HDL subclasses in acute ischemic stroke: prediction of risk and short-term mortality. *Atherosclerosis*. 2010;210:548-54.
307. Kathiresan S, Otvos JD, Sullivan LM, Keyes MJ, Schaefer EJ, Wilson PW, et al. Increased small low-density lipoprotein particle number: a prominent feature of the metabolic syndrome in the Framingham Heart Study. *Circulation*.2006; 113: 20–9.
308. Festa A, Williams K, Hanley AJG, Otvos JD, Goff DC, Wagenknecht LE, et al. Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in prediabetic subjects in the insulin resistance atherosclerosis study. *Circulation*. 2005;111: 3465–72.
309. Maahs DM, Dabelea D,D’Agostino RB, Jr, Andrews JS, Shah AS, Crimmins N,et al. Glucose Control Predicts 2-Year Change in Lipid Profile in Youth with Type 1 Diabetes. *J Pediatr*.2013;162:10.
310. Purnell JQ, Hokanson JE, Cleary, Nathan DM, Lachin JM, Zinman B, et al. The Effect of Excess Weight Gain With Intensive Diabetes Mellitus Treatment on Cardiovascular Disease Risk Factors and Atherosclerosis in Type 1 Diabetes Mellitus. *Circulation*. 2013;127:180-7.
311. Persson L, Cao G, Ståhle L, Sjöberg BG, Troutt JS, Konrad RJ,et al. Circulating proprotein convertase subtilisin kexin type 9 has a diurnal rhythm synchronous with cholesterol synthesis and is reduced by fasting in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30: 2666-72.
312. Cariou B, Le Bras M, Langhi C, Le May C, Guyomarc'h-Delasalle B, Krempf M, et al. Association between plasma PCSK9 and gamma-glutamyl transferase levels in diabetic patients. *Atherosclerosis*. 2010;211:700-2.
313. Li S, Guo YL, Xu RX, Zhang Y, Zhu CG, Sun J, et al. Plasma PCSK9 levels are associated with the severity of coronary stenosis in patients with atherosclerosis. *Int J Cardiol*. 201;174:863-4.
314. Nozue T, Hattori H, Ogawa K, Kujiraoka T, Iwasaki T, Hirano T, et al. Correlation between serum levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and atherogenic lipoproteins in patients with coronary artery disease. *Lipids Health Dis*. 2016;15:165.
315. Kwakernaak AJ, Lambert G, Dullaart RP. Plasma proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 is predominantly related to intermediate density lipoproteins. *Clin Biochem*. 2014;47:679-82.
316. Leander K, Mälärstig A, van’t Hooft FM, Hyde C, Hellénus M,Troutt J, et al. Circulating Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Predicts Future Risk of Cardiovascular Events Independently of Established Risk Factors. *Circulation*.2016.133:1230-9.
317. Ding Z, Liu S, Wang X, Theus S, Deng X, Fan Y, et al. PCSK9 regulates expression of scavenger receptors and ox-LDL uptake in macrophages. *Cardiovasc Res*. 2018;11:1145-53.
318. Krauss R, Banerjee P, Hamon S, Hanotin C, Saiela W, Koren M, et al . Alirocumab, fully human monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, and its

- effects on lipoprotein subfractions determined by ion mobility. *Circulation*. 2014;130:A15525.
319. Ghosh M, Galman C, Rudling M, Angelin B. Influence of physiological changes in endogenous estrogen on circulating PCSK9 and LDL cholesterol. *J Lipid Res* 2015; 56:463-9.
 320. Glerup S, Schulz R, Laufs U, Schlüter KD. Physiological and therapeutic regulation of PCSK9 activity in cardiovascular disease. *Basic Res Cardiol*. 2017;112:32.
 321. Quantikine® ELISA Human Proprotein Convertase 9/PCSK9 Immunoassay. [Internet] Minneapolis:R&D Systems.c 2019 [cited 2019,Nov1]. Available from: https://www.rndsystems.com/products/human-proprotein-convertase-9-pcsk9-quantikine-elisa-kit_dpc900#product-details
 322. Bergman BC, Howard D, Schauer IE, Maahs DM, Snell-Bergeon JK, Eckel RH, et al. Features of hepatic and skeletal muscle insulin resistance unique to type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97:1663–72.
 323. Bagdade JD, Dunn FL, Eckel RH, Ritter MC. Intraperitoneal insulin therapy corrects abnormalities in cholesteryl ester transfer and lipoprotein lipase activities in insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14:1933–9.
 324. Cree-Green M, Maahs DM, Ferland A, Hokanson JE, Wang H, Pyle L, et al. Lipoprotein subfraction cholesterol distribution is more atherogenic in insulin resistant adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* . 2016;17: 257–65.
 325. Maahs DM, Nadeau K, Snell-Bergeon JK, et al. Association of insulin sensitivity to lipids across the lifespan in people with Type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2011; 28:148–155.
 326. Toms TE, Panoulas VF, Kitas GD. Dyslipidaemia in Rheumatological Autoimmune Diseases. *The Open Cardiovasc Med J* 2011;5: 64-75.
 327. Leeds JS, Hopper AD, Hadjivassiliou M, Tesafye S, Sanders DS. Potential coeliac disease in Type 1 diabetes mellitus: Does a positive antibody lead to increased complications? *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014;24:378-83.
 328. Rybak A, Cukrowska B, Socha J, Socha P. Long term follow up of coeliac disease-is atherosclerosis a problem? *Nutrients*. 2014;6:2718-2.
 329. Björck S, Lindehammer SR, Fex M, Agardh D. Serum cytokine pattern in young children with screening detected coeliac disease. *Clin Exp Immunol*. 2015;179:230-5.
 330. Myśliwiec M, Balcerska A, Zorena K, Myśliwska J, Wiśniewski P. Immunologic and biochemical factors of coincident coeliac disease and type 1 diabetes mellitus in children. *Pediatr Res*. 2008;64:677-81.
 331. Guedj K, Khallou-Laschet J, Clement M, Morvan M, Delbosc S, Gaston AT, et al. Inflammatory micro-environmental cues of human atherothrombotic arteries confer to vascular smooth muscle cells the capacity to trigger lymphoid neogenesis. *PLoS One*. 2014;9:e116295.
 332. Lim H, Kim Y, Sun H, Lee J, Reynolds J, Hanabuchi S, et al. Proatherogenic Conditions Promote Autoimmune T Helper 17 Cell Responses In Vivo. *Immunity*. 2014;40:153–65.
 333. Fazaeli M, Khoshdel A, Shafiepour M, Rohban M. The influence of subclinical hypothyroidism on serum lipid profile, PCSK9 levels and CD36 expression on monocytes. *Diabetes Metab Syndr*. 2019; 13:312–6.
 334. Isguven P, Gunduz Y, Kilic M. Effects of thyroid autoimmunity on early atherosclerosis in euthyroid girls with Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2016; 8:150–6.
 335. Hine D, Mackness B, Mackness M. Coincubation of PON1, APO A1, and LCAT increases the time HDL is able to prevent LDL oxidation. *IUBMB Life*. 2012;64: 157-61.
 336. Ouimet M, Barrett TJ, Fisher EA. HDL and Reverse Cholesterol Transport. *Circ Res*. 2019;124:1505-18.
 337. Gopee E, van der Oever EL, Cameron F, Thomas MC. Coeliac disease, gluten-free diet and the development and progression of albuminuria in children with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2013;14:455-8.

338. Felner EI, White PC. Improving management of diabetic ketoacidosis in children. *Pediatrics*. 2001;108:735-40.
339. Kaizer EC, Glaser CL, Chaussabel D, Banchereau J, Pascual V, White PC. Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:3705-11.
340. Han D, Leyva CA, Matheson D, Mineo D, Messinger S, Blomberg BB. Immune profiling by multiple gene expression analysis in patients at-risk and with type 1 diabetes. *Clin Immunol*. 2011;139:290-301.
341. Halminen M, Simell O, Knip M, Ilonen J. Cytokine Expression in Unstimulated PBMC of Children with Type 1 Diabetes and Subjects Positive for Diabetes-Associated Autoantibodies. *Scand J Immunol*. 2001;53:510-3.
342. Abbasi F, Amiri P, Sayahpour FA, Pirmoradi S, Abolhalaj M, Larijani B, et al. TGF- β and IL-23 gene expression in unstimulated PBMCs of patients with diabetes. *Endocrine*. 2012;41:430-4.
343. Jin Y, Sharma A, Carey C, Hopkins D, Wang X, Robertson DG, et al. The expression of inflammatory genes is upregulated in peripheral blood of patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2013; DC_121986.
344. 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. *J Immunol*. 2010;185:3814-8.
345. You S, Thieblemont N, Alyanakian MA, Bach JF, Chatenoud L. Transforming growth factor-beta and T-cell-mediated immunoregulation in the control of autoimmune diabetes. *Immunol Rev*. 2006;212:185-202.
346. 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 Inflamm*. 2013;2013:205284.
347. Kempf K, Haltern G, Füh R, Herder C, Müller-Scholze S, Gülker H, Martin S. Increased TNF-alpha and decreased TGF-beta expression in peripheral blood leukocytes after acute myocardial infarction. *Horm Metab Res*. 2006;38:346-51.
348. Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 1996;45:522-30.
349. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, et al. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 8015-20.
350. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009; 139: 871-90.
351. Hills CE, Squires PE. The role of TGF-beta and epithelial-to mesenchymal transition in diabetic nephropathy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011; 22: 131-9.
352. Herman-Edelstein M, Thomas MC, Thallas-Bonke V, Saleem M, Cooper ME, Kantharidis P. Dedifferentiation of immortalized human podocytes in response to transforming growth factor-beta: a model for diabetic podocytopathy. *Diabetes*. 2011; 60: 1779-88.
353. Sam R, Wanna L, Gudehithlu KP, Garber SL, Dunea G, Arruda JA, Singh AK. Glomerular epithelial cells transform to myofibroblasts: early but not late removal of TGF-beta1 reverses transformation. *Transl Res*. 2006; 148: 142-8.
354. Pfeiffer A, Schatz H. Diabetic microvascular complications and growth factors. *Exp Clin Endocrinol diabetes* 1995;103(1):7-14.
355. Hathaway CK, Gasim AM, Grant R, Chang AS, Kim HS, Madden VJ, et al. Low TGF β 1 expression prevents and high expression exacerbates diabetic nephropathy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112:5815-20.

356. Souilhol C, Harmsen MC, Evans PC, Krenning G. Endothelial–mesenchymal transition in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*.2018; 114: 565–77.
357. Chen PY, Qin L, Baeyens N, Li G, Afolabi T, Budatha M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression. *J Clin Invest*. 2015;125:4514–28.
358. Chatauret N, Favreau F, Giraud S, Thierry A, Rossard L, Le Pape S, Lerman LO, Hauet T. Diet-induced increase in plasma oxidized LDL promotes early fibrosis in a renal porcine auto-transplantation model. *J Transl Med* 2014; 12:76.
359. Grainger DJ. TGF- β and atherosclerosis in men. *Cardiovasc Res*. 2007;74:213-22.
360. Wang XL, Liu XS, Wilcken DE. Circulating transforming growth factor beta 1 and coronary artery disease. *Cardiovasc Res*. 1997;34:404-10.
361. Okamoto Y, Gotoh Y, Uemura O, Tanaka S, Ando T, Nishida M. Age-dependent decrease in serum transforming growth factor (TGF)-beta 1 in healthy Japanese individuals; population study of serum TGF-beta 1 level in Japanese. *Dis Markers*. 2005;21:71–4.
362. Panousis C, Evans G, Zuckerman S. TGF-beta increases cholesterol efflux and ABC-1 expression in macrophage-derived foam cells: opposing the effects of IFN-gamma. *J Lipid Res*. 2001;42:856–63.
363. Durning S, Preston-Hurlburt P, Clark P, Xu D, Herold K. The receptor for advanced glycation end products drives Tcell survival and inflammation in type 1 diabetes mellitus. *J Immunol*. 2016;197:3076-85.
364. Akirav EM, Preston-Hurlburt P, Garyu J, Henegariu O, Clynes R, Schmidt AM, Herold KC. RAGE expression in human T cells: a link between environmental factors and adaptive immune responses. *PLoS One*. 2012; 7:e34698.
365. 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. *J Exp Med*. 2013; 210:2447–63.
366. Miura J, Uchigata Y, Yamamoto Y, Takeuchi M, Sakurai S, Watanabe T, et al. AGE down-regulation of monocyte RAGE expression and its association with diabetic complications in type 1 diabetes. *J Diabetes Complications* 2004;18:53-9.
367. Salonen KM, Ryhänen SJ, Forbes JM, Borg DJ, Härkönen T, Ilonen J, et al. Decrease in circulating concentrations of soluble receptors for advanced glycation end products at the time of seroconversion to autoantibody positivity in children with prediabetes. *Diabetes Care*. 2015;38:665-70.
368. Dettoraki A, Gil AP, Spiliotis BE. Association between serum levels of the soluble receptor (sRAGE) for advanced glycation endproducts (AGEs) and their receptor (RAGE) in peripheral blood mononuclear cells of children with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2009;22:895-904.
369. Saito R, Araki S, Yamamoto Y, Kusahara K. Elevated endogenous secretory receptor for advanced glycation end products (esRAGE) levels are associated with circulating soluble RAGE levels in diabetic children. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2017;30:63-9.
370. Schmidt AM, Stern D. Atherosclerosis and diabetes: the RAGE connection. *Curr Atheroscler Rep*. 2000;2:430-6.
371. Zhang F, Kent KC, Yamanouchi D, Zhang Y, Kato K, Tsai S, et al. Anti-receptor for advanced glycation end products therapies as novel treatment for abdominal aortic aneurysm. *Ann Surg*. 2009;250:416-23.
372. Uemura S, Matsushita H, Li W, Glassford AJ, Asagami T, Lee KH, Harrison DG, Tsao PS. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res*. 2001;88:1291-8.
373. Nakamura K, Yamagishi S, Adachi H, Matsui T, Kurita-Nakamura Y, Takeuchi M, et al. Serum levels of soluble form of receptor for advanced glycation end products (sRAGE) are positively associated with circulating AGEs and soluble form of VCAM-1 in patients with type 2 diabetes. *Microvasc Res*. 2008;76:52-6.

374. Nin JWM, Ferreira I, Schalkwijk ICG, Prins MH, Chaturvedi N, Fuller JH, et al. Levels of soluble receptor for AGE are cross-sectionally associated with cardiovascular disease in type 1 diabetes, and this association is partially mediated by endothelial and renal dysfunction and by low-grade inflammation: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia* 2009; 52:705–14.
375. Katakami N, Matsuhisa M, Kaneto H, Matsuoka TA, Sakamoto K, Yasuda T, et al. Serum endogenous secretory RAGE level is an independent risk factor for the progression of carotid atherosclerosis in type 1 diabetes. *Atherosclerosis*. 2009;204:288-92.
376. Katakami N, Matsuhisa M, Kaneto H, Matsuoka TA, Sakamoto K, Nakatani Y, et al. Decreased endogenous secretory advanced glycation end product receptor in type 1 diabetic patients: its possible association with diabetic vascular complications. *Diabetes Care*. 2005;28:2716-21.
377. Heier, M, Margeirsdottir, H.D., Gaarder, M. Knut Haakon Stensæth, Cathrine Brunborg, Peter Abusdal Torjesen, et al. Soluble RAGE and atherosclerosis in youth with type 1 diabetes: a 5-year follow-up study. *Cardiovasc Diabetol*.2015; 14:126.
378. Nin JWM, Jorsal A, Ferreira I, Schalkwijk CG, Prins MH, Parving HH, et al. Higher plasma soluble Receptor for Advanced Glycation End Products (sRAGE) levels are associated with incident cardiovascular disease and all-cause mortality in type 1 diabetes: a 12-year follow-up study. *Diabetes*. 2010;59:2027-32.
379. Harja E, Bu DX, Hudson BI, Chang JS, Shen X, Hallam K, Kalea AZ, et al. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice. *J Clin Invest*. 2008;118:183–94.
380. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*. 2003;111:1805–12.
381. Yamashita H, Shimada K, Seki E, Mokuno H, Daida H. Concentrations of interleukins, interferon, and C-reactive protein in stable and unstable angina pectoris. *Am J Cardiol*. 2003;91:133–6.
382. Sproston NR, Ashworth JR. Role of C-Reactive protein at sites of inflammation and infection. *Front Immunol*. 2018; 9: 754.
383. Li L, Roumeliotis N, Sawamura T, Renier G. C-reactive protein enhances LOX-1 expression in human aortic endothelial cells: relevance of LOX-1 to C-reactive protein-induced endothelial dysfunction. *Circ Res* 2004;95:877–83.
384. Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation*. 2001;103:1194-7.
385. Wadham C, Albanese N, Roberts J, Wang L, Bagley CJ, Gamble JR, et al. High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity. *Circulation*. 2004;109:2116–22.
386. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJ et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med* 2008;359:2195–207.
387. Cheng JM, Oemrawsingh RM, Garcia-Garcia HM, et al. PCSK9 in relation to coronary plaque inflammation: Results of the ATHEROREMO-IVUS study. *Atherosclerosis* 2016;248:117–22.
388. Tang ZH, Peng J, Ren Z, Yang J, Li TT, Li TH, et al. New role of PCSK9 in atherosclerotic inflammation promotion involving the TLR4/NF-κB pathway. *Atherosclerosis* 2017;262:113–22.
389. Cao YX, Li S, Liu HH, Li JJ. Impact of PCSK9 monoclonal antibodies on circulating hs-CRP levels: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open* 2018;8:e022348.
390. Sahebkar A, Di Giosia P, Stamerra CA, Grassi D, Pedone C, Ferretti G, et al. Effect of monoclonal antibodies to PCSK9 on high-sensitivity C-reactive protein levels: a meta-

- analysis of 16 randomized controlled treatment arms. *Br J Clin Pharmacol*. 2016; 81:1175–190.
391. Svensson M, Sundkvist G, Arnqvist H, Bjork E, Blohme G, Bolinder J, et al. Signs of nephropathy may occur early in young adults with diabetes despite modern diabetes management. *Diabetes Care*. 2003;26:2903–9.
 392. Mohsin F, Craig ME, Cusamano J, Chan AK, Hing SJ, Lee JW, Silink M, Howard NJ, Donaghue KC, et al. Discordant trends in microvascular complications in adolescents with type 1 diabetes from 1990 –2002. *Diabetes Care*. 2005; 28:1974 –80.
 393. Perkins BA, Ficociello LH, Silva KH, Finkelstein DM, Warram JH, Krolewski AS. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2003;348:2285-93.
 394. Krolewski AS, Niewczas MA, Skupien J, Gohda T, Smiles A, Eckfeldt JH, et al. Early progressive renal decline precedes the onset of microalbuminuria and its progression to macroalbuminuria. *Diabetes Care* Jan. 2014; 37:226-34.
 395. Donaghue KC, Fairchild JM, Craig ME, Chan AK, Hing S, Cutler LR, et al. Do all prepubertal years of diabetes duration contribute equally to diabetes complications? *Diabetes Care*. 2003; 26:1224 –9.
 396. Couper JJ, Clarke CF, Byrne GC, Jones TW, Donaghue KC, Nairn J, et al. Progression of borderline increases in albuminuria in adolescent swith insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med*. 1997;14:766 –71.
 397. Moran A, Jacobs D, Steinberger J, Hong C, Prineas R, Luepker R, Sinaiko A. Insulin resistance during puberty. *Diabetes*. 1999; 48:2039 –44.
 398. Dunger DB, Schwarze CP, Cooper JD, Widmer B, Neil HA, Shield J, et al. Can we identify adolescents at high risk for nephropathy before the development of microalbuminuria? *Diabet Med*. 2007;24:131-6.
 399. Marcovecchio L, Chiesa ST, Armitage J, Daneman D, Donaghue KC, Jones TW, et al. Renal and cardiovascular risk according to tertiles of urinary albumin-to-creatinine ratio: The adolescent type 1 diabetes Cardio-Renal Intervention Trial (AddIT). *Diabetes Care*. 2018, 41:1963-9.
 400. Bonnet F, Cooper ME. Potential influence of lipids in diabetic nephropathy: insights from experimental data and clinical studies. *Diabetes Metab* 2000;26:254–64.
 401. Chaturvedi N, Fuller H, Taskinen MR. Differing associations of lipid and lipoprotein disturbances with the macrovascular and microvascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2001;24:2071-7.
 402. Abrass CK. Cellular lipid metabolism and the role of lipids in progressive renal disease. *Am J Nephrol* 2004;24:46–53.
 403. Cooper ME. Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet*. 1998;352:213-9.
 404. Ding G, van Goor H, Ricardo SD, Orłowski JM, Diamond JR. Oxidized LDL stimulates the expression of TGF-beta and fibronectin in human glomerular epithelial cells. *Kidney Int*. 1997;51:147-54.
 405. Srivastava SP, Shi S, Koya D, Kanasaki K. Lipid mediators in diabetic nephropathy. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2014;7:12.
 406. Sibley SD, Hokanson JE, Steffes MW, Purnell JQ, Marcovina SM, Cleary PA, Brunzell JD. Increased small dense LDL and intermediate-density lipoprotein with albuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 1999; 22:1165-70.
 407. Marcovecchio ML, Dalton RN, Prevost AT, Acerini CL, Barrett TG, Cooper JD, et al. Prevalence of abnormal lipid profiles and the relationship with the development of microalbuminuria in adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2009; 32:658-63.
 408. Russo LM, Comper WD, Osicka TM. Mechanism of albuminuria associated with cardiovascular disease and kidney disease. *Kidney Int*. 2004; 92:67–8.

409. Russo LM, del Re E, Brown D, Lin HY. Evidence for a role of transforming growth factor (TGF)- β 1 in the induction of postglomerular albuminuria in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2007;56: 380-8.

BIOGRAFIJA

Dragana Bojanin je rođena 29. 4. 1968. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Beogradu. Diplomirala je na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na smeru medicinska biohemija, u martu 1994. godine. Diplomski rad pod naslovom „Klinički značaj β_2 -mikroglobulina“ odbranila je na Katedri za medicinsku biohemiju, pod mentorstvom prof. dr Vesne Spasojević-Kalimanovske. Zaposlena je na neodređeno vreme u Biohemijskoj laboratoriji Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ od juna 1995. godine.

Završila je specijalizaciju iz medicinske biohemije sa odličnim uspehom u maju 2000. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Specijalistički rad „Značaj biohemijskih parametara u bilijarnoj atreziji“ urađen je pod mentorstvom prof. dr Zorane Jelić-Ivanović.

Završila je subspecijalizaciju iz kliničke imunohemije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, februara 2012. godine. Subspecijalistički rad pod nazivom „Primena elektrohemioluminiscentnog imunotesta za određivanje NT-proBNP kod novorođenčadi sa urođenim srčanim manama“, urađen je pod mentorstvom prof. dr Zorane Jelić-Ivanović.

Doktorske studije na modulu za Medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Univerziteta u Beogradu je upisala školske 2014/2015. godine. Kao autor ili koautor objavila je devet radova u međunarodnim časopisima M21, M22 i M23 kategorije, kao i radove u domaćim stručnim časopisima. Učestvovala je radovima u formi saopštenja na domaćim i međunarodnim naučnim skupovima. Iz doktorske disertacije publikovala je dva rada, jedan u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21) i jedan u istaknutom međunarodnom časopisu (M22).

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Драгана Бојанин

Број индекса 31/14

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Рани липидни и инфламаторни маркери атеросклерозе код деце са типом 1

дијабетес мелитуса: утицај метаболичке контроле и коморбидитета

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 7. 5. 2020.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Драгана Бојанин

Број индекса 31/14

Студијски програм Медицинска биохемија

Наслов рада Рани липидни и инфламаторни маркери атеросклерозе код деце са типом 1 дијабетес мелитуса: утицај метаболичке контроле и коморбидитета

Ментор Проф. др Весна Спасојевић-Калимановска и Проф. др Јелена Векић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 7. 5. 2020.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Рани липидни и инфламаторни маркери атеросклерозе код деце са типом 1

дијабетес мелитуса: утицај метаболичке контроле и коморбидитета

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ③. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 7. 5. 2020.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.