

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Zvonimir Bosnić

**INTERLEUKINI 17A I IL-37 KAO BILJEZI FENOTIPSKIH PODTIPOVA
OBOLJELIH OD DIJABETESA TIPA 2**

Doktorski rad

Osijek, 2023.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Zvonimir Bosnić

**INTERLEUKINI 17A I IL-37 KAO BILJEZI FENOTIPSKIH PODTIPOVA
OBOLJELIH OD DIJABETESA TIPA 2**

Doktorski rad

Osijek, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti

Znanstvena polja: Temeljne medicinske znanosti i Biologija

INTERLEUKINI 17A I IL-37 KAO BILJEZI FENOTIPSKIH PODTIPOVA OBOLJELIH OD DIJABETESA TIP 2

Zvonimir Bosnić

Doktorski rad je izrađen pri Katedri za obiteljsku medicinu Medicinskog fakulteta u Osijeku, ordinacijama obiteljske medicine Slavonski Brod, Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku OB "Dr. Josip Benčević" Slavonski Brod i Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Osijek.

Mentor 1: izv. prof. dr. sc. Ljiljana Trtica Majnarić, dr. med

Mentor 2: izv. prof.dr.sc. Mario Štefanić, dr. med

Kratki sažetak doktorskog rada: (oko 400 znakova)

Grupiranje upalnih markera, NLR-a i citokina IL-17A i IL-37 daje bolji uvid u skrivene fenotipove T2D i njihovu patofiziološku pozadinu. Za procjenu povezanosti upalnih markera s drugim kliničkima varijablama korišteni su višestruki regresijski modeli. Rezultati doktorskog rada pokazali su da su citokini varijabilniji od markera NLR. Grupiranje upalnih markera bilo je potrebno kako bi se ukazalo na razlike među klasterima pacijenata oboljelih od T2D, a time ukazalo i na razlike u napredovanju oštećenja ciljnih organa i nastanku vaskularnih komplikacija.

Broj stranica: 157

Broj slika: 22

Broj tablica: 18

Broj literaturnih navoda: 209

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: kronična upala; T2D, IL-17A; IL-37; složene kronične bolesti; skriveni fenotipovi; podskupine; tehnike klasteriranja

Datum obrane:

Povjerenstvo za obranu:

1. Izv. prof.dr.sc. Tatjana Bačun, dr. med (predsjednik Povjerenstva)
2. Izv. prof. dr. sc. Valentina Pavić, (član Povjerenstva)
3. Prof.dr.sc. Vera Cesar (član Povjerenstva)
4. Zamjena člana Povjerenstva: Prof. dr.sc. Ivica Mihaljević, dr. med

Doktorski rad je pohranjen u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary area of science
Scientific Fields: Basic medical sciences and biology

INTERLEUKINS 17A AND IL-37 AS MARKERS OF PHENOTYPIC SUBTYPES OF PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES

Zvonimir Bosnić

Thesis performed at: Department of Family medicine, Faculty of Medicine Osijek, Family medicine practice, Department of Laboratory Diagnostics General Hospital "Dr. Josip Benčević" and Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Osijek University Hospital Centre

Supervisor 1: Professor, Ljiljana Trtica Majnarić, PhD

Supervisor 2 : Professor, Mario Štefanić, PhD

Short abstract:

We hypothesized that by clustering inflammatory marker, NLR and the cytokines IL-17A and IL-37 we could gain insights into the hidden phenotypes of T2D and the underlying pathophysiological backgrounds. Multiple regression models were used to assess associations of inflammatory markers with other variables. The cytokines were more variable than the marker NLR. The set of inflammatory markers was needed to indicate the capacity of patients in the clusters for inflammatory cell recruitment from the circulation to the tissues, and subsequently for the progression of end-organ damage and vascular complications.

Number of pages: 157

Number of figures: 22

Number of tables: 18

Number of references: 209

Original in: Croatian

Key words: chronic inflammation; D2T; IL-17A; IL-37; complex chronic diseases; phenotyping; clustering techniques

Date of the thesis defense:

Reviewers:

1. Prof. Tatjana Bačun, PhD
2. Prof. Valentina Pavić, PhD
3. Prof. Vera Cesar, PhD,
4. (substitute), Prof. Ivica Mihaljević, PhD

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Zahvala

Neizmjereno i veliko hvala mentorici, izv. prof. dr. sc. Ljiljani Trtici Majnarić, na stručnom vodstvu, korisnim savjetima te nesebičnoj pomoći, strpljivosti i razumijevanju pri izradi ovog doktorskog rada. Svaki Vaš kritički osvrt poticao me je da idem dalje, da još više učim, upijam nova znanja i iskustva, i time još više zavolim znanstveno- istraživački rad.

Hvala i komentoru izv. prof. dr. sc. Mariu Štefaniću na korisnim i stručnim savjetima pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem se svim zaposlenicima Odjela za laboratorijsku dijagnostiku OB "Dr. Josip Benčević" Slavonski Brod i Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC Osijek, na pomoći u eksperimentalnom dijelu doktorskog rada.

Zahvaljujem se i svim kolegama iz obiteljske medicine koji su pomogli u prikupljanju podataka za potrebe izrade doktorskog rada.

Veliko hvala prof. dr. sc. Veri Cesar, mojoj studijskoj savjetnici, koja je nesebično odvojila mnogo vremena savjetujući me i vodeći tijekom poslijediplomskog doktorskog studija.

.

Doktorski rad posvećujem svojim roditeljima, koji su mi pružili nesebičnu podršku, razumijevanje i bezuvjetno strpljenje te uvijek bili najveći oslonac u svim trenucima.

Hvala Vam što ste uvijek vjerovali u mene.

SADRŽAJ

Popis kratica

1. UVOD	1
1.1. Akutna upala kao vitalna reakcija organizma i faze akutne upale	1
1.2. Uloga citokina nespecifične imunosti u propagaciji upalne reakcije	2
1.3. Rezolucija upalne reakcije – konflikt s razvojem kronične upale	5
1.4. Stečena (specifična) imunost i podklase limfocita T (uloga pro-upalnih citokina u razvoju stanične imunosti).....	6
1.5. Pro-upalni efektorski put Th1/Th17 u autoimunim bolestima i kroničnim bolestima starenja.....	8
1.6. Dijabetes tipa 2 kao sistemska upalna bolest.....	11
1.7. Uloga kronične upale u razvoju multisistemskog oštećenja organa u kardio-metaboličkim bolestima.....	12
1.8. Upalni biljezi u predikciji povećanog KV rizika.....	13
1.8.1. IL-17A i IL-37 kao noviji upalni biljezi povećanog KV rizika	13
1.9. Pro-upalni učinci citokina IL-17A i uloga u razvoju oštećenja organa u kardio-metaboličkim bolestima.....	15
1.10. Pretpostavljeni imunosni mehanizmi u kroničnoj upali povezanoj s oštećenjem organa u kardio-metaboličkim bolestima	16
1.11. Mehanizmi protu-upalnog djelovanja citokina IL-37.....	17
1.12. Imunološka memorija u nespecifičnom imunosnom sustavu (eng. Trained immunity) i IL-37	18
1.13. Metaboličko reprogramiranje u kroničnoj upali i uloga u pomicanju ravnoteže između protu-upalnih i upalnih imunosnih mehanizama	21
1.14. Dosadašnja istraživanja o ulozi citokina IL-17A i IL-37 u kroničnoj upali povezanoj s oštećenjem organa u kardio-metaboličkim bolestima	22
1.15. Dijabetes tipa 2 kao heterogena kompleksna bolest (povezanost sa starenjem, s nastankom multimorbiditeta).....	25
1.16. Primjena metode klasteriranja podataka i naprednih molekularno-bioloških i kompjuterskih tehnologija (sistemske-biološkog pristupa) u ispitivanju heterogenosti osoba oboljelih od dijabetesa tipa 2	25
2. HIPOTEZE.....	27
3. CILJEVI	28

4. MATERIJALI I METODE	29
4.1. Ustroj istraživanja	29
4.2. Ispitanici	29
4.3. Materijali i metode	30
4.3.1. Ispitivanje sociodemografskih podataka i kliničkih obilježja pacijenata te testovi probira	30
4.3.2. Laboratorijsko ispitivanje	32
4.3.3. Enzimski imunotest- Sendvič ELISA test	33
4.3.4. Određivanje serumske koncentracije IL-17A i IL-37	34
4.3.5. Statističke metode	36
5. REZULTATI	38
5.1. Sociodemografski podaci	38
5.2. Raspodjela vrijednosti citokina IL-17A i IL-37 prema kvartilama	45
5.2.1 Interleukin IL-17A	45
5.2.2 Interleukin IL-37	55
5.3. Granične vrijednosti citokina IL-17A i IL-37 za pojedine podskupine bolesnika s T2D	69
5.3.1. Interleukin IL-17A	69
5.3.2 Interleukin IL-37	77
5.4. Rezultati klaster-analize	91
6. RASPRAVA	98
6.1. Rasprava glavnih rezultata	99
6.2. Rasprava mehanizama s naglaskom na regresijske modele	101
6.3. Originalnost istraživanja za potrebe doktorskog rada	116
6.4. Ograničenja provedenog istraživanja	117
6.5. Dobiveni rezultati koji se uklapaju u poznato	117
6.6. Što se može dalje istražiti?	119
7. ZAKLJUČCI	121
8. LITERATURA	123
9. SAŽETAK	145
10. SUMMARY	147
11. ŽIVOTOPIS	149

Popis kratica

ACE-INH	inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima (eng. <i>Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors</i>)
ALT	alanin amino-transferaza
ANG II	angiotenzin II
ARBs	blokatori angiotenzin II receptora (eng. <i>Angiotensin Receptor Blockers</i>)
AST	aspartat amino-transferaza
ATP	adenozin- trifosfat
CAC	eng. <i>Citric Acid Cycle</i>
CAD	koronarna arterijska bolest (eng. <i>Coronary Artery Disease</i>)
CMV	citomegalovirus
CRP	C reaktivni protein
CVD	kardiovaskularne bolesti (eng. <i>Cardiovascular Disease</i>)
DAMPs	molekularni obrasci povezani s opasnošću (eng. <i>Danger-Associated Molecular Patterns</i>)
DPP4inh	eng. <i>Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor</i>
eGFR	procijenjena brzina glomerularne filtracije (eng. <i>Estimated Glomerular Filtration Rate</i>)
ELISA	enzimsko imunokemijska metoda (engl. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
FoxP3	transkripcijski faktor Foxp3
G-CSF	faktor stimulacije granulocitnih kolonija (eng. <i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>)
GGT	gama-glutamilttransferaza
GLP1RA	glukagonu sličan peptid 1 receptor agonist (eng. <i>Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists</i>)
GM-CSF	eng. <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HDL	lipoprotein visoke gustoće (eng. <i>High-Density Lipoprotein</i>)
HCT	hematokrit

Hif-1	hipoksijom inducibilan faktor 1
HRP	peroksidaza hrena
IFN- α	interferon α
IFN- γ	interferon γ
IL	interleukin
IL-18BP	interleukin 18 vezni protein
IL-1R	receptor za interleukin 1
IFNs	interferon tip1 (eng. <i>The Type-I Interferons IFN</i>)
IKK	protein IKK kinaza
IRAK	eng. <i>Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase</i>
KAB	koronarna arterijska bolest
KBS	kronična bolest srca
KV	kardiovaskularni
KVB	kardiovaskularne bolesti
MCH	srednji sadržaj hemoglobina u eritrocitu
MCHC	srednja koncentracija hemoglobina u eritrocitu
MCV	srednji volumen eritrocita
MHC	sustav tkivne snošljivost (eng. <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MMP	enzimi matriks-metaloproteaze (eng. <i>Matrix Degrading Metalloproteinases</i>)
MS	metabolički sindrom
MyD88	adapterska molekula MyD88
NET	izvanstanične zamke neutrofila (eng. <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>)
NF- κ B	čimbenik transkripcije (eng. <i>Transcription Factor Nuclear Factor Kappa B</i>)
NK-stanice	prirodnoubilačke stanice (eng. <i>Natural Killer</i>)
NLR	omjer neutrofila i limfocita (eng. <i>Nutrophil-To Lymphocyte Ratio</i>),
NLRP3	multiroteinski kompleks inflamasoma NLRP3
NO	dušikov (II) oksid
NSAID	nesteroidni protuupalni lijekovi (eng. <i>Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs</i>)

PAMPs	molekularne strukture patogena (eng. <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>)
PRR	eng. <i>Pattern recognition receptors</i>
ROR γ t	eng. <i>Retinoic acid-related orphan receptor gamma</i>
ROS	reaktivne kisikove vrste (eng. <i>Reactive oxygen species</i>)
SGLT2	inhibitori kotransportera natrij glukoza 2 (eng. <i>Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors</i>)
SASP	sekretorni fenotip povezan sa starenjem (eng. <i>Senescence-associated secretory phenotype</i>)
SMK	slobodne masne kiseline
TAK1	protein TAK1
T2D	dijabetes tipa 2
TG	trigliceridi
Th1	pomoćničke T stanice tipa 1
Th2	nosioci humoralnog imunskog odgovora
Th17	nosioci kronične upale
TGF- β	transformirajući faktor rasta beta (eng. <i>Transforming Growth Factor</i>)
TIR	eng. <i>Toll-like Interleukin 1 Receptor</i>
TLR	eng. <i>Toll- like receptors</i>
TMB	tetrametilbenzidin
TNF α	čimbenik tumorske nekroze alfa (eng. <i>Tumor Necrosis Factor-α</i>)
TRAF6	protein TRAF6
Treg	regulacijski T- limfociti
TSH	tireostimulin

1. UVOD

1.1. Akutna upala kao vitalna reakcija organizma i faze akutne upale

Upala je dio urođenog obrambenog mehanizma tijela protiv infektivnih ili neinfektivnih čimbenika s jasnim ciljem održanja funkcionalnog i strukturnog integriteta tkiva i organa (Medzhitov 2021). Nespecifična ili prirođena imunost prva je i glavna obrana organizma protiv štetnog utjecaja neke tvari ili mikroorganizma, te prva koja se aktivira i bez prethodnoga dodira s tim antigenom (Mogensen 2009). Ona pruža otpornost protiv infekcije i u većini slučajeva djeluje djelotvorno s glavnim ciljem uklanjanja patogenih mikroorganizama, iako može usmjeriti i pojačati specifičnu imunost tako da ona bude optimalno djelotvorna protiv određenog patogena (Vivier i Malissen 2005). Za razliku od specifične imunosti, prirođena imunost putem svojih receptora specifično prepoznaje "molekularne uzorke" izražene na površini patogenih bakterija, virusa i gljivica, (PAMP, eng. *Pathogen-associated molecular patterns*) (Kim i sur., 2016). Dalje interakcijom receptora i mikrobnih molekularnih uzoraka, dolazi do aktivacije neutrofila, makrofaga, komplementa, čime se pospješuje fagocitoza i stimulira produkcija interferona kao važnog efekorskog mehanizma prirođene imunosti (Lentsch i Ward 2000).

Mehanizam nastanka i faze akutne upale dobro su poznate, a ključni događaj u nastanku upalne reakcije podrazumijeva migraciju stanica leukocita iz malih krvnih žila na mjesto infekcije ili ozljede praćeno vazodilatacijom i istjecanjem plazme. Vaskularne endotelne stanice u početku bubre, zatim se kontrahiraju kako bi se povećao prostor između njih, čime se povećava propusnost vaskularne barijere, a cjelokupni proces reguliran je kemijskim medijatorima. Eksudacija tekućine dovodi do gubitka tekućine iz vaskularnog prostora u intersticijski prostor, što rezultira nastankom lokalnog edema. Nakupljanje tekućine u intersticiju, djeluje kao medij kroz koji upalni proteini kao što su komplement i imunoglobulini mogu migrirati što zauzvrat pojačava upalnu reakciju (Varela i sur., 2018). Kratko vrijeme nakon što započne upalni odgovor, aktivira se program za rješavanje upale s glavnim ciljem popravka oštećenog tkiva. Da bi proces razvoja akutne upale tekao koordinirano, dolazi do promjene u biosintetskim putevima, uključujući procese proliferacije, diferencijacije i programirane stanične smrti (apoptoze) (Serhan i Levy 2018). Kada intenzitet lokalne upalne reakcije postane veći, aktivira se i sustavni upalni

odgovor praćen mobilizacijom upalnih i imunskih stanica koštane srži, dolazi do povećane sinteze proteina akutne faze u jetri, aktivacije neuroendokrinog odgovora na stres i promjene u metaboličkim putovima (Varela i sur., 2018). Ove sustavne reakcije su samo privremene i imaju zaštitnu ulogu. U staničnoj fazi, neutrofil, makrofagi i NK-stanice (eng. *Natural Killer*) su glavne efektorske stanice nespecifične imunosti (Raulet 2004; Germolec i sur., 2018). Dalje aktivirani makrofagi luče proupalne citokine, čimbenik tumorske nekroze alfa TNF (eng. *Tumor necrosis factor- α*), interleukin 1 (IL-1) i kemokine koji pospješuju upalnu reakciju i citokine interferon γ (IFN γ), IL-12, IL-15 koji pospješuju predočivanje antigena glavnom sustavu tkivne snošljivosti MHC (eng. *Major histocompatibility complex*) i kostimulacijskih molekula, te aktiviraju i usmjeruju razvoj adaptivne humoralne i stanične imunosti. Aktivacija NK-stanica ovisi o međureakciji brojnih inhibicijskih i aktivacijskih receptora i njihovih liganda (Raulet 2004).

1.2. Uloga citokina nespecifične imunosti u propagaciji upalne reakcije

Jasno je da aktivacija staničnih i molekularnih događaja tijekom akutne upale nastoji minimalizirati prijeteću štetu, i potaknuti obnovu tkiva kako bi se održala homeostaza. Ipak, prekomjerno izlaganje vanjskim ili unutarnjim štetnim agensima, dovodi do dugotrajne stimulacije nespecifičnog imunskog sustava, što za posljedicu ima kontinuirano lučenje u cirkulaciju i okolna tkiva, pro-upalnih citokina i drugih upalnih medijatora kao što su TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18 te interferon α (IFN- α).

Poznato je da su IL-1 β i IL-1 α prvi članovi obitelji citokina IL-1 koji su otkriveni, i koji imaju proupalna svojstva, zbog čega se ističe amplificirajuća uloga IL-1 citokinske obitelji u propagaciji upalne reakcije. Dugo se smatralo da cijela obitelj citokina IL-1 ima ulogu u pojačavanju urođenog imunološkog i upalnog odgovora, no tehnološki napredak omogućio je otkriće novih citokina iz ove obitelji s pro- i protuupalnim svojstvima (Dinarello CA 2018). Također je utvrđeno i da članovi obitelji receptora IL-1 (IL-1R) sadrže i molekule koje djeluju kao negativni regulatori stanične signalizacije (Boraschi i sur., 2018).

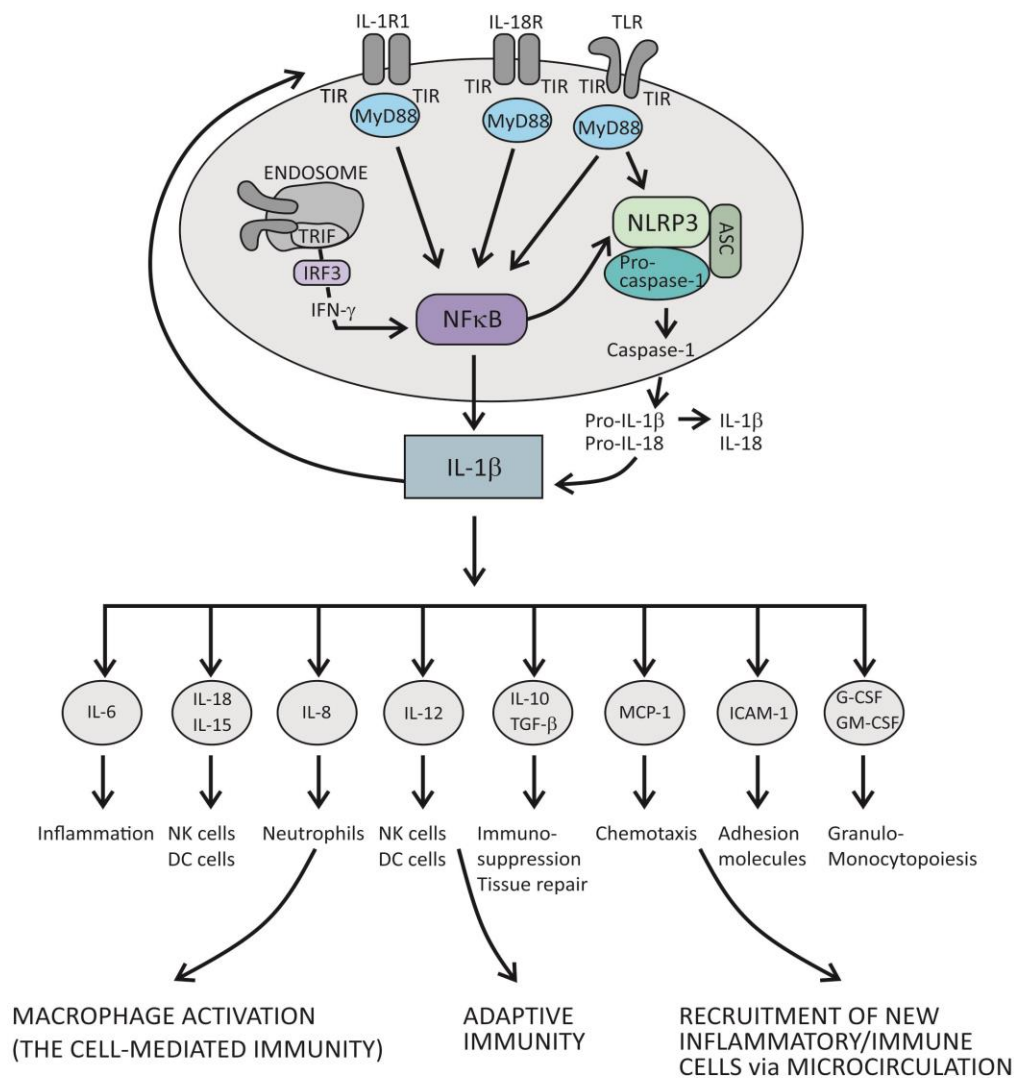
Danas, nakon što su sve molekule iz obitelji IL-1 identificirane i klasificirane prema jedinstvenoj nomenklaturi, jasnija je uloga ovog signalnog sustava u mehanizmu samokontrole i finom podešavanju proupalnih učinaka, s glavnim ciljem očuvanja tkiva zahvaćenog upalom, od

nepotrebnih kolateralnih oštećenja i autoimunih reakcija (Fitzgerald i Kagan 2020). Tu se ističu antagonisti receptora IL-1 i IL-36 (IL-1Ra i IL-36Ra), supresorski citokini IL-37 i IL-38, te molekule koje inhibiraju receptore, kao što je IL-18 vezni protein (IL-18BP), a glavni zadatak im je održavanje kontrole nad neobuzdanom upalnom reakcijom (Molgora i sur., 2016; Fitzgerald i Kagan 2020). Brojne su kontrolne točke duž IL-1 ovisnih unutarstaničnih signalnih putova, u kojima varijacije u koncentracijama supstrata ili promjene u komponentama mogu poslužiti kao ograničavajući čimbenici i mogu inhibirati širenje proupalnih signala (Fitzgerald i Kagan 2020).

Vežanje citokina IL-1 β ili IL-1 α na njihov membranski IL-1R1 receptor u stanicama urođenog imunološkog sustava, dovodi do strukturnih promjena koje omogućuju koreceptorskoj molekuli IL-1R3 da pristupi i formira funkcionalni tripartitni receptorski kompleks. Unutarstanična signalizacija se odvija preko unutarstaničnih domena ove dvije komponente receptora, koje su strukturno slične unutarstaničnim domenama Toll-like receptorima, zbog čega nazivaju Toll IL-1R (TIR) domene. Kada se TIR domene približe jedna drugoj, stvaraju se uvjeti za vežanje na adaptersku molekulu MyD88, pri čemu ova molekula postaje fosforilirana i sposobna pokrenuti kanonski aktivacijski signal za unustarstanične kinaze (IRAK) (Dinarello CA 2018) (Slika 1). IL-1 β ima veliku ulogu u poticanju proupalnog puta, a uključuje proteine TRAF6 i TAK1 i IKK kinaze, što dovodi do aktivacije transkripcijskog faktora nuklearnog faktora kapa B (NF- κ B), koji ima ključnu ulogu u regulaciji velikog niza gena uključenih u upalne i imunološke odgovore (Dinarello CA 2018) (Slika 1).

U konačnici, uloga obitelji citokina IL-1 zapravo je pojačati ili fino podesiti odgovor nespecifične imunosti, posredovane odgovorom na antigene koje prepoznaju urođeni imunološki receptori kao što su Toll-like receptori (TLR). Oni su prikazani na površini urođenih imunoloških stanica, uključujući uglavnom makrofage, dendritičke stanice i neutrofile, ili su smješteni unutarstanično, NLR obitelj receptora (eng. *Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing*), koji mogu formirati multiproteinske komplekse poznate kao inflammasomi (Slika 1) (Kelley i sur., 2019). Oni pak dalje aktiviraju proteolitičke enzime kaspaze-1 što dovodi do konverzije neaktivnih u aktivne oblike upalnih citokina (IL-1 β , IL-18 i IL-33) te njihove povećane sekrecije na mjestu upale. S obzirom da molekule obitelji IL-1 i TLR dijele slične funkcije u pružanju urođenog imunološkog odgovora, ova dva signalna sustava dijele istu grupu citosolnih TIR domena, iz čega je jasno vidljivo da proupalni citokini iz obitelji IL-1 mogu inicijalno pojačati

upalne signale generirane receptorima TLR (Slika 1) (Fitzgerald i Kagan 2020). Postoji još jedan važan put pojačanja upale s produljenim učincima, a uključuje nove transkripcije molekula prekursora proupalnih citokina IL-1 β i IL-18 i komponenti inflamatoskog receptora NLRP3 (Slika 1).



Slika 1. Uloga obitelji citokina IL-1 u promociji upale

Preuzeto i prilagođeno prema Trtica Majnarić L., i sur., 2022.

1.3. Rezolucija upalne reakcije – konflikt s razvojem kronične upale

Definirano je nekoliko glavnih izvora kronične upale, koji osim upalnog odgovora na mikrobnе komponente, uključuju i upalne procese povezane sa starenjem (eng. *Inflammaging*). To su prije svega dugotrajna stimulacija receptora nespecifičnog imunskog sustava, i površinskih (kao što su Toll-like receptori) i unutarstaničnih (kao što su inflammasomi). I dalje kao stimulacijski agensi, važni su infektivni agensi s kojim se čovjek susreće tijekom života, kao što su infekcija citomegalovirusom (CMV). U starijoj dobi, sve veću ulogu imaju i vlastite endogene molekule, koje nastaju kao posljedica oštećenja tkiva ili oksidacijskih i drugih promjena na makromolekulama, a tu spadaju i produkti probave hrane te molekularne strukture crijevnih komenzalnih bakterija. Posljedično dugotrajnoj stimulaciji nespecifičnog imunskog sustava dolazi do kontinuiranog lučenja pro-upalnih citokina i drugih upalnih medijatora u okolna tkiva i u cirkulaciju. Svojom sposobnošću razlaganja matriksa vezivnog tkiva, enzimi matriks-metaloproteinaze, MMP (eng. *Matrix degrading metalloproteinases*) pomažu propagaciji upale u tkivima te sudjeluju i u procesu remodeliranja tkiva (Li, T. i sur., 2020; Franceschi C i sur., 2018).

Kao važan izvor upale navode se i ostarjele stanice koje se nakupljaju u tkivima (eng. *Cellular senescence*) (Pawelec 2020). Riječ je o stanicama koje su izgubile svoju normalnu sposobnost dijeljenja, a stekle su tzv. sekretorni fenotip povezan sa starenjem, SASP (eng. *Senescence-associated secretory phenotype*), tj. sposobnost lučenja velikih količina pro-upalnih medijatora. Tu se posebno ističu matične i progenitorske mezenhimalne stanice. Starenje stanica prati i promjena staničnih mehanizama, koji su najvećim dijelom odgovorni za pokretanje unutarstaničnih upalnih signalnih puteva, a to su poremećaj proteostaze, mitohondrijskog zdravlja i autofagije (mehanizam kojim se stanica rješava oštećenih organela). Dolazi i do smanjenog mehanizma odstranjenja disfunkcionalnih proteinskih molekula, što doprinosi nakupljanju takvih denaturiranih makromolekula i njihovih agregata u tkivima, čime se dodatno mijenja arhitektura tkiva, te ometa proces obnavljanja tkiva, a te molekule predstavljaju i dodatan izvor upale i oksidacijskog stresa (Li, T. i sur., 2020; Franceschi i sur., 2018). Važnu ulogu ima i epigenetsko remodeliranje, koje kulminira opsežnim rearanžmanom staničnog prepisivanja gena.

Do sada su opisani i drugi sterilni upalni signali nazvani molekularni obrasci povezani s opasnošću DAMPs, eng. *Danger-associated molecular patterns*, a oslobađaju se tijekom

oštećenja tkiva i iniciraju upalni odgovor (Zindel i Kubes 2020). Funkcioniraju kao međustanični obrambeni signali interakcijom s PRR receptorima (eng. *Pattern recognition receptors*), a pokreću urođeni, odnosno upalni imunosti odgovor, koji uključuje aktivaciju rezidentnih leukocita (npr. makrofaga, dendritičnih stanica, mast stanica), proizvodnju upalnih medijatora (citokina, kemokina i lipidnih metabolita), privlačenje neutrofila i monocita / makrofaga, što za cilj ima uklanjanje ozlijeđenih tkiva (Li, D. 2021; Wu, M. 2021). Njihovo otpuštanje u izvanstaničnu okolinu događa se primarno kada stanica podliježe nekrozi, jer su nekrotične stanice imunostimulirajuće i dovode do daljnje infiltracije upalnih stanica i proizvodnje citokina. Stvaranje ROS-a (eng. *Reactive oxygen species*), destabilizacija lizosomske membrane, aktivacija proteaza i promjene ionskog toka povezani su s nekrozom, te mogu aktivirati sterilne upalne putove uz oslobađanje DAMP molekula. Iako tipično nije povezana s imunogenošću i upalom, apoptoza može postati upalna u uvjetima u kojima dolazi do odgođenog čišćenja i uklanjanja apoptotskih stanica, što se može dogoditi u slučaju prekomjerne apoptoze. Takvi događaji rezultiraju sekundarnom nekrozom s gubitkom integriteta plazmatske membrane te posljedično otpuštanjem endogenih DAMP molekula (Gong i sur., 2020).

1.4. Stečena (specifična) imunost i podklase limfocita T (uloga pro-upalnih citokina u razvoju stanične imunosti)

Starenje imunostnog sustava (eng. *Immunosenescence*), uz navede promjene u nespecifičnom imunostnom sustavu, zahvaća i stanice specifičnog imunostnog sustava, što se očituje kroz broj i funkciju stanica limfocita, i u konačnici dovodi do smanjene sposobnosti toga sustava da odgovara na potrebe zaštite organizma od infekcija ili od rasta tumora, a povezano je i s povećanjem ukupnog stupnja upale (Hickman i Turka 2005). Jedna od važnih značajki upalne reakcije u sklopu kroničnih bolesti je brojčano i fenotipsko remodeliranje stanica specifične imunosti, T- limfocita, posebno CD4+ tipa, tj. regulacijskih (Treg) i pomoćničkih T- limfocita. Glavne podskupine Treg i pomoćničkih T- limfocita, Th1, Th2 i Th17 međusobno se razlikuju po profilu lučenja citokina i funkcijama koje obavljaju tijekom imunostne reakcije.

Da bi se održala homeostaza, potrebno je njihovo usklađeno djelovanje, a svaka promjena u broju ili aktivnosti neke od tih podskupina dovodi do intenziviranja imunostne reakcije u određenom smjeru, što je povezano s kroničnom upalom i pojavom bolesti.

Ranija istraživanja imunosne reakcije kroničnih upalnih bolesti crijeva dovela su do promjene dosadašnje paradigme da polarizacija Th0 (naivnih) Th limfocita ide ili u smjeru Th-1 limfocita, ili u smjeru Th-2 limfocita, na što je ukazala plastičnost podpopulacije Th-17 limfocita, za koju se pokazalo da može mijenjati svoj fenotip i u Th1 i u Treg tip, a uz sve postoje i zajednički Th1/Th17 i Th17/Treg fenotipovi. Dokazano je da proupalni mikrookoliš potiče razvoj Th17 limfocita. Također uočeno je i da ako nema proupalnog mikrookoliša, nema ni aktivacije transkripcijskog čimbenika ROR γ t koji je potreban (premda ne i dovoljan) za razvoj tog puta, pa razvoj ide ili prema aktivaciji transkripcijskih čimbenika T-bet (Th1) ili Foxp3 (Treg) (pregledno prikazano u Majnarić Trtica i sur., 2018).

Do povećanja stupnja upale aktivacijom specifičnog imunosnog sustava najviše dolazi jer se u uvjetima oštećenja i upale tkiva, kao što je to uslijed prisustva komorbiditetnih stanja, narušava mehanizam periferne imunološke tolerancije, pri čemu se pomiče ravnoteža od dominantne aktivnosti tzv. regulacijskih T-limfocita (Treg), prema aktivaciji efektorskih Th17-limfocita i akumulaciji iscrpljenih stanica.

Aktivnost toga imunosnog puta povezana je s podržavanjem kronične upale, mobilizacijom upalnih i imunosnih stanica u tkiva, reakcijom na endogene antigene, kao i pojačanim remodeliranjem tkiva. Te aktivnosti su povezane s povećanom produkcijom pro-upalnih citokina tipa IL-17A, IL-6, IL-21 i IL-23 (Kroemer i Zitvogel 2020).

Najnovija istraživanja ukazuju da u tijeku starenja sve veću ulogu imaju promijenjeni CD4⁺ T-limfociti, koji zbog poremećaja funkcije mitohondrija i povećanog unutarstaničnog oksidacijskog stresa postaju osjetljiviji i potaknuti na dugotrajno lučenje citokina iz skupine IL-17A (Kroemer i Zitvogel 2020).

Međuovisnost u razvoju limfocitnih podpopulacija, kao i brza promjena njihove dinamičke ravnoteže još više dolazi do izražaja u odnosima Treg i Th17 tipova limfocita.

Danas se naglasak sve više stavlja i na disbiozu (poremećaj sastava i heterogenosti) crijevne mikroflore, koja nastaje sa starenjem, a prati ju povećana propusnost sluznice gastrointestinalnog trakta za antigene i fekalne metabolite iz crijeva, što u konačnici doprinosi razvoju metaboličkih i upalnih promjena, koje se smatraju pokretačima razvoja bolesti starenja (Li T i sur., 2020; Franceschi C i sur., 2018).

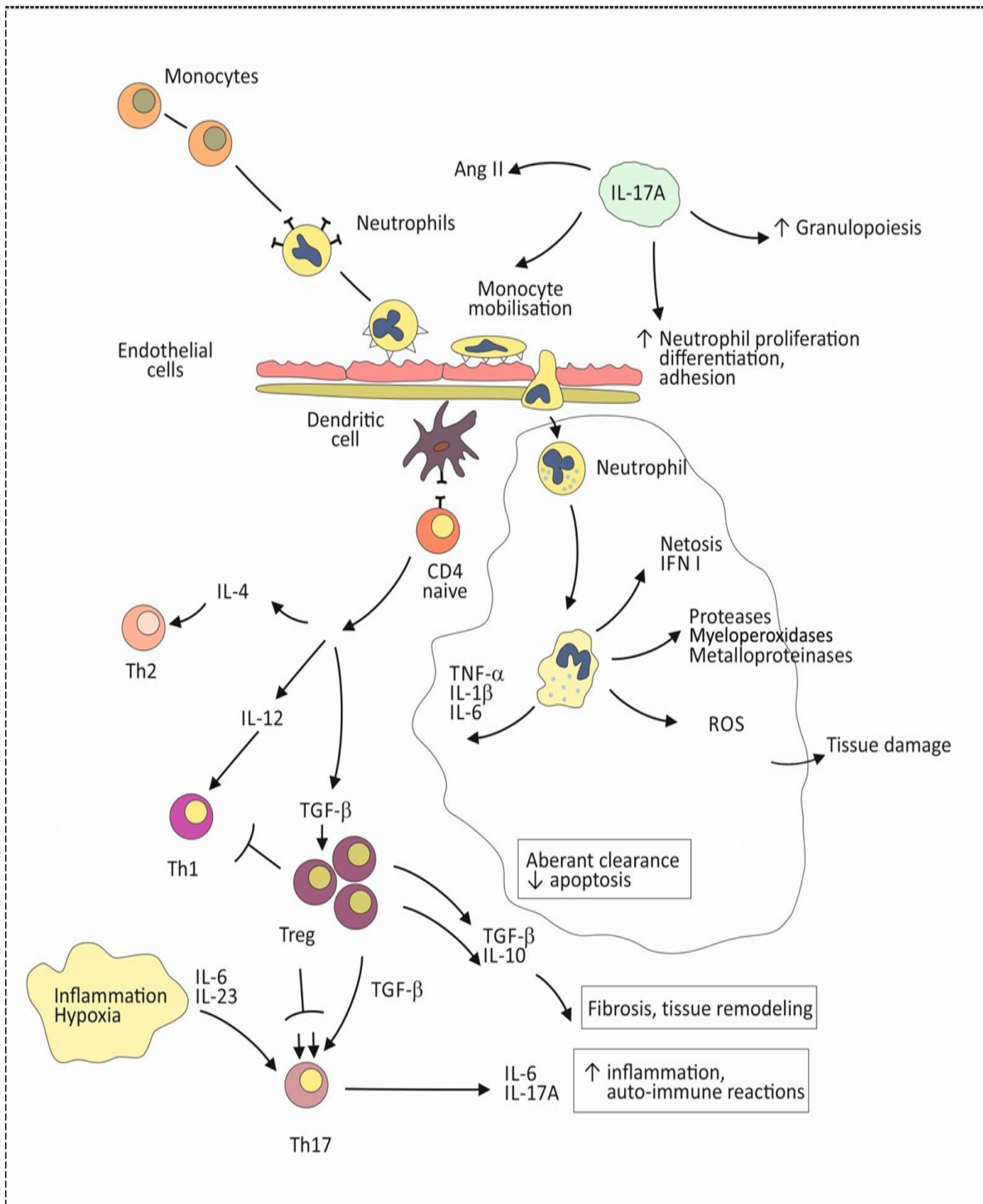
1.5. Pro-upalni efektorski put Th1/Th17 u autoimunim bolestima i kroničnim bolestima starenja

Kako je ranije rečeno, starenje je povezano s povećanjem razine sistemske upale, koja se smatra glavnim pokretačem u razvoju kardiovaskularnih i kroničnih bolesti povezanih sa starenjem (Franceschi i sur., 2018). Brojni su izvori proupalnih citokina, uključujući TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 i IFNs I, koji su vezani sa starenjem stanica i starenjem imunološkog sustava (Bupp 2015). Dugotrajna izloženost egzogenim antigenima i povećana stimulacija vlastitim antigenima, potiče kroničnu aktivaciju urođenih imunoloških stanica (dendritičkih stanica i makrofaga), kontinuiranu aktivaciju Th1/Th17 proupalnog imunološkog puta i pomak prema autoimunim reakcijama (Slika 2). Na taj način dolazi do održavanja kronične upale i kontinuiranog oštećenja tkiva (Kleinewietfeld i Hafler 2013; Ma, S. i sur., 2019). U stanjima kao što su ateroskleroza i oštećenje ciljnih organa povezanih s KV čimbenicima rizika, gdje dolazi do nastanka endotelne disfunkcije, povećana je intravaskularna aktivacija stanica neutrofila i njihova translokacija u tkiva (Ley i sur., 2006).

Brojni su mehanizmi kojim neutrofilu potiču oštećenje tkiva, a neki od njih su oslobađanje velike količine proupalnih citokina, proteolitičkih i oksidacijskih enzima te ROS (Mortaz i sur., 2018). Oni također potiču stvaranje izvanstaničnih zamki neutrofila (NET, eng. *Neutrophil extracellular traps*) čime dodatno pojačavaju upalu (Slika 2). U tkivu zahvaćenom upalom, dolazi do povećane proizvodnje citokina IL-23 iz stanica nespecifične imunosti. On je glavni pokretački citokin u osovini IL-23/IL-17, koji potiče ekspanziju Th17 limfocita (Slika 2) (Iwakura i sur., 2006). Starenjem imunološkog sustava dolazi do lučenja citokina IL-17A, čime se dodatno pojačava kronična upala i potiče mobilizacija neutrofila u upalno promijenjeno tkivo. Kompenzacijsko širenje Treg stanica može dovesti do povećane proizvodnje protuupalnih citokina, kao što je transformirajući faktor rasta beta TGF- β (eng. *Transforming growth factor*), koji je uključen u procese remodeliranja tkiva i fibroze (Frangogiannis 2020).

Ranije i već postojeće oštećenje tkiva, uslijed kardiometaboličkih bolesti može dodatno pojačati sve ove spomenute mehanizme (Bupp 2015), npr. aktivacijom renin-angiotenzin-aldosteron sustava, sekrecijom adipokina u pretilosti, ili akumulacijom produkata glikacije u šećernoj bolesti.

Slijedom navedenog, povećana adhezija aktiviranih leukocita na površini disfunkcionalnog endotela mikrocirkulacije i njihovo pojačano regrutiranje iz cirkulacije u upalno tkivo, i dalje ostaju glavnim mehanizmom u oštećenju ciljnih organa i procesu ateroskleroze. U povećanju upale tkiva i oštećenju ciljnih organa sudjeluje i tkivni angiotenzin II (Ang II), koji potiče mobilizaciju imunoloških stanica u tkivu, proizvodnju ROS-a i fibrozu tkiva (Slika 2) (Frangogiannis 2020).



Slika 2. Imunološki mehanizmi uključeni u razvoj kardiovaskularnih bolesti

Preuzeto i prilagođeno prema Trtica Majnarić L., i sur., 2021.

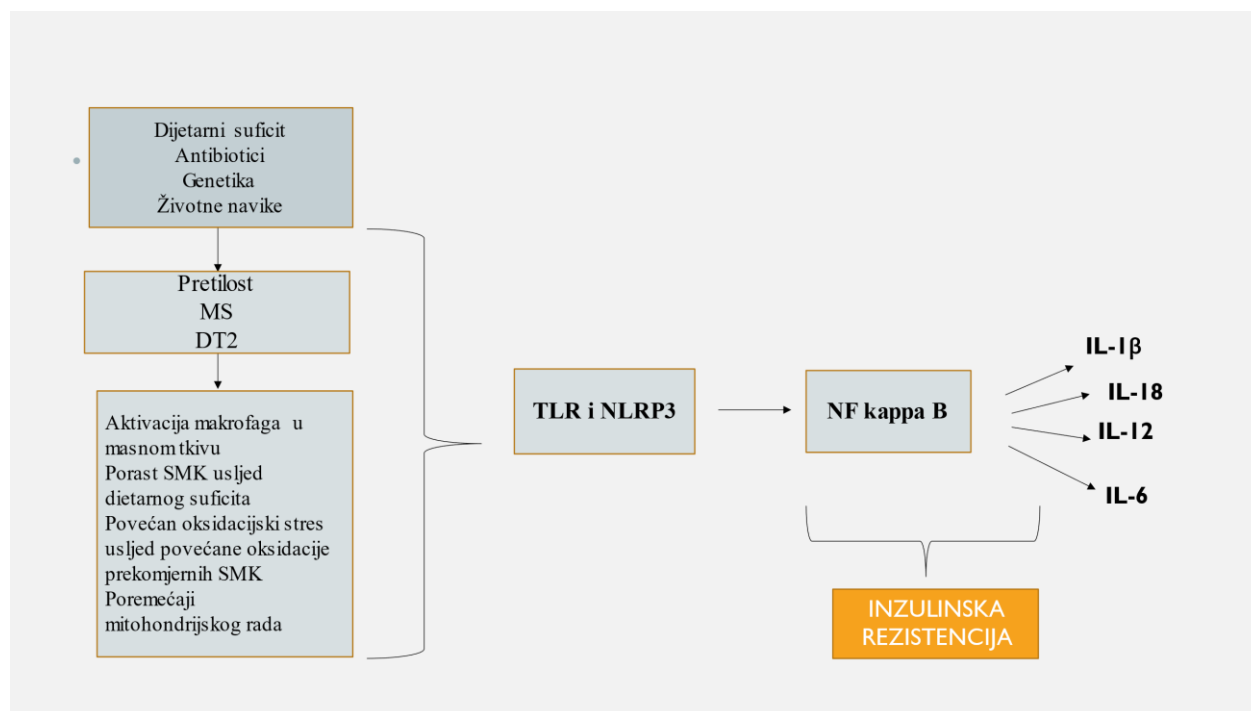
1.6. Dijabetes tipa 2 kao sistemska upalna bolest

Dijabetes tipa 2 (T2D) predstavlja globalni javno-zdravstveni problem zbog rastuće prevalencije u čitavom svijetu (Cho i sur., 2018). To je bolest starije životne dobi s naglijim porastom incidencije nakon 50-te godine. Povezana je s visokim rizikom za nastanak vaskularnih komplikacija, osobito kardiovaskularnih bolesti (KVB) i preuranjenim mortalitetom (Rea i sur., 2018). Kronična upala se smatra glavnim mehanizmom starenja i razvoja kroničnih bolesti. To je najbolje dokazano za KVB i T2D. Poznato je da postoji interakcija između upale, metaboličkih i vaskularnih poremećaja, u zajedničkoj patofiziološkoj osnovi koja povezuje te bolesti (Global Burden of Metabolic Risk Factors for Chronic Diseases Collaboration 2014; Abdelhafiz i sur 2010). Već u vrijeme postavljanja dijagnoze, dio osoba s T2D će imati KVB, što je rezultat djelovanja zajedničkih mehanizama, kao što su inzulinska rezistencija, upala i disfunkcija bijelog masnog tkiva i endotelnih stanica, kojom međusobno povezani poremećaji, a to su prekomjerna jelesna težina, hipertenzija i T2D, utječu na razvoj mikro- i makro-vaskularnih promjena (Franceschi i sur., 2018).

Pretilost, koja je najvažniji precipitirajući čimbenik za nastanak T2D te porast masnog tkiva uslijed promjena oblika i sastava tijela povezanih sa starenjem, glavni su izvor kronične upale niskog stupnja u osoba s T2D (Forman i sur., 2018). Slijedom navedenog, masno tkivo djeluje kao ishodište upale, tj. kao središnje mjesto za lučenje različitih bioaktivnih molekula kao što su citokini, masne kiseline i kemokini, koji dalje promoviraju infiltraciju masnog tkiva makrofagima i upalu. Naime, metaboličke promjene u pretilosti i T2D kao što su porast slobodnih masnih kiselina (SMK) uslijed dietarnog deficita, povećan oksidacijski stres uslijed povećane oksidacije prekomjernih SMK te poremećaja mitohondrijske funkcije, dodatni su stimulansi za aktivaciju nespecifične imunosti, što se naziva „meta-upalom“ (Franceschi i sur., 2018).

Prepoznato je da se isti proupalni unutarstanični signalni putovi aktiviraju neovisno o tome koji su uzroci u podlozi, bilo kao odgovor na infekciju, ili u situacijama kada su metabolički poremećaji i prisutnost kroničnih bolesti potaknuli oštećenje tkiva (Prajapati i sur., 2014; Wang X i sur., 2020; Sepehri i sur., 2017 i Loftus i sur., 2016). U tom kontekstu, inflammasomi – molekularni kompleksi koji imaju ulogu „drugih glasnika“ u stanici, igraju ključnu ulogu kroz svoje učinke u integraciji proupalnih signala i modulaciji metaboličkih putova, uglavnom kontroliranjem proizvodnje proupalnih citokina (Meyers i Zhu 2020).

Sukladno tome, povećana aktivnost inflammasoma NLRP3 pronađena je u metaboličkim i KV stanjima (Prajapati i sur., 2014; Litwiniuk i sur., 2021)



Slika 3. Dijabetes tipa 2 kao upalna bolest

Preuzeto i prilagođeno prema Prajapati B., i sur., 2014.

1.7. Uloga kronične upale u razvoju multisistemskog oštećenja organa u kardio-metaboličkim bolestima

Kronična upala smatra se glavnim mehanizmom starenja i razvoja kroničnih bolesti (Rea i sur., 2018). Brojni su dokazi iz observacijskih i molekularno-bioloških istraživanja, na osnovu kojih je doneseno mišljenje da najčešće zastupljene kronične bolesti kao što su ateroskleroza, KVB, T2D, osteoporoza i demencija dijele zajedničke patofiziološke mehanizme s procesom starenja (Franceschi i sur., 2018). Također, uočeno je i da je utjecaj okolišnih čimbenika važniji od genetike u usmjeravanju tijeka starenja prema “neuspješnom starenju”, odnosno starenju opterećenom kroničnim bolestima i funkcionalnim oštećenjima (Bennett i sur., 2018; Franceschi i sur., 2018).

Brojni su izvori upale kod starijih osoba, pri čemu su glavni izvori starenje stanica i kronična aktivacija urođenih imunoloških receptora (Franceschi i sur., 2018; Majnarić i sur., 2021), ekspanzija mijeloidne loze, i nakupljanje iscrpljenih, disfunkcionalnih T stanica.

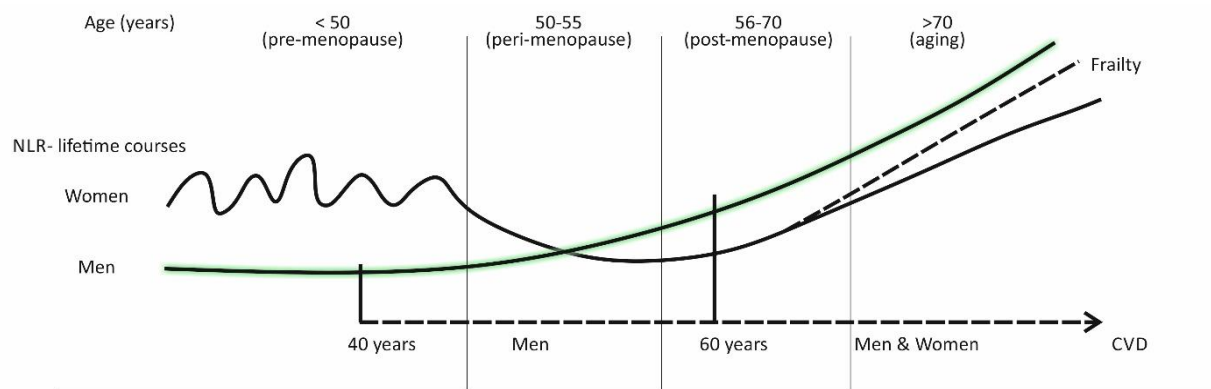
Promjene u obliku i strukturi tijela koje se javljaju starenjem, uključujući gubitak mišića i povećanje visceralne masti, značajno doprinose upalnom procesu i razvoju inzulinske rezistencije, koji zajedno povećavaju rizik od metaboličkih i vaskularnih poremećaja (Franceschi C i sur., 2018). Važno je napomenuti da postoji individualna razlika u brzini razvoja navedenih promjena. Ranija manifestacija kronične bolesti odraz je ubrzanije dinamike starenja, a već nastale kronične bolesti svojim mehanizmima dodatno ubrzavaju proces starenja i skraćuju životni vijek. Sukladno navedenom, na proces starenja i razvoj bolesti starenja, može se gledati kao niz alternativnih vremenskih putanja (trajektorija) istog procesa, koji se odvija po različitim stopama ubrzanja, što je rezultat interakcije između genetskih, epigenetskih i okolišnih čimbenika te načina života. Unatoč silnim naporima, dinamika putanje, kao i fenotipska obilježja osoba na pojedinim putanjama, nisu još poznati. Ipak najnovija shvaćanja procesa starenja, ukazuju na to da do povećanja stupnja upale tijekom starenja dolazi zbog uzajamnog sinergističkog djelovanja upalnih procesa povezanih sa starenjem, nazvanih inflammaging, i metaboličkih promjena, nazvanih metaflammation, koje mogu biti dodatno pojačane u slučaju povećanog kalorijskog unosa (kalorijskog suficita) i prisustva pretilosti (Franceschi C i sur., 2018). Inflammaging i meta-upala, kao i općenito mehanizam starenja, dijele zajedničke molekularne mehanizme.

1.8. Upalni biljezi u predikciji povećanog KV rizika

1.8.1. IL-17A i IL-37 kao noviji upalni biljezi povećanog KV rizika

Duži niz godina upalni biljezi kao što su citokin IL-6 i reaktant akutne faze C reaktivni protein (CRP), koristili su se kao standard u stratifikaciji rizika bolesnika s KV čimbenicima rizika (Volpato i sur., 2001). U posljednje vrijeme sve više se prednost daje omjeru neutrofila i limfocita NLR (eng. *Neutrophil-to-lymphocyte ratio*), novijem pokazatelju upale, ekonomičnom i široko dostupnom za populacijska istraživanja i istraživanja u primarnoj zdravstvenoj zaštiti (Angkananard i sur., 2018). Pokazao se kao povoljan biomarker koji odražava upalne procese povezane s tkivom i napredovanjem ateroskleroze te oštećenjem ciljnih organa (Gubbels 2015 ; Trtica Majnarić i sur., 2021). Činjenica da granične vrijednosti toga biljega za predviđanje

pojedinih nepovoljnih stanja i/ili ugroženih podskupina bolesnika nisu definirane, onemogućava rutinsku primjenu toga biljega (Corriere i sur., 2018; Vaduganathan i sur., 2012). Jedna od mana je i ta što se vrijednosti NLR ne povećavaju linearno sa starenjem u žena i kao takve ne mogu biti dobar pokazatelj povećanog KV rizika u žena u post-menopauzi u odnosu na žene u premenopauzi (Slika 4) (Trtica Majnarić i sur., 2021).



Slika 4. Životni tijek upalnog markera "Omjer neutrofila i limfocita" (NLR)

Preuzeto i prilagođeno prema Trtica Majnarić L., i sur., 2021.

Kao pokazatelji upalne aktivnosti u stanjima u kojima zbog prisustva KV rizičnih čimbenika dolazi do razvoja oštećenja ciljnih organa i vaskularnih komplikacija, sve više se istražuju i citokini IL-17A i IL-37, od kojih prvi ima pro-upalnu, a drugi protu-upalnu ulogu. Sve više se istražuje uloga IL-17A u kardio-metaboličkim bolestima povezanim sa starenjem. Dokazano je da IL-17A potiče mobilizaciju upalnih stanica iz cirkulacije u tkiva, posebno u vezi s neutrofilima i Th17 limfocitima, glavnim efektorskim stanicama u kroničnoj upali povezanoj s tkivom (Iwakura i sur., 2006). Također potiče i promicanje kronične bubrežne bolesti uzrokovane dijabetesom (Ma, J. i sur., 2019). Za razliku od IL-17A, IL-37 je biomarker s protuupalnim učinkom, a uključen je u smanjenje upale izazvane visokim sadržajem glukoze i oksidativnog stresa kao i oštećenja organa uzrokovane ovim mehanizmima (Su, Z. i sur., 2021; Li, T. i sur.,

2019). Konstitutivna ekspresija IL-37 je niska, ali snažno raste na poticaj upalnim čimbenicima. Iako su provedene brojne eksperimentalne i kliničke studije, razlike u serumskoj koncentraciji IL-37 u bolesnika s T2D s obzirom na prisustvo komorbiditeta, vaskularnih komplikacija i KV rizičnih čimbenika nisu do sada mjerene.

1.9. Pro-upalni učinci citokina IL-17A i uloga u razvoju oštećenja organa u kardio-metaboličkim bolestima

Brojni su dokazi koji ukazuju da povećana proizvodnja proupalnih citokina, kao što su TNF- α , IL-1 β , IL-18 i IL-6, inducira inzulinsku rezistenciju, što dodatno pogoršava metaboličke poremećaje i upalu, dovodeći do začaranog kruga metaboličkih, upalnih i vaskularnih poremećaja (Sepethri i sur., 2017). Sve više je dokaza da osim uloge urođenog imunološkog sustava u tim procesima, vitalnu ulogu ima stečena imunost, osobito obitelj citokina IL-17 koje proizvode CD4⁺ T pomoćničke 17 (Th17) stanice (Chang i sur., 2021; Ip i sur., 2016). Sastav citokina u mikrookolišu regulira ravnotežu između proupalnih Th17 stanica i regulacijskih T limfocita (Treg) (Zhang i sur., 2021). Prisutnost TGF- β nužna je za diferencijaciju obje stanične linije od naivnih CD4⁺ Th0 stanica, a kao presudan čimbenik u određivanju smjera te diferencijacije ističe se citokin IL-6, koji potiče diferencijaciju Th17 stanica. Daljnja signalizacija citokinima IL-23 ili IL-1 β neophodna je za njihovu promociju u patogeni fenotip (Wu i Wan 2020). Th1 specifični citokin IFN- γ također doprinosi njihovoj patogenosti, što dovodi do uspostavljanja proupalnog Th1/Th17 puta (Zhang i sur., 2021). Na taj način su stvoreni uvjeti u mikrookolišu koji pogoduju razvoju proupalnog Th1/Th17 puta (Zi i sur., 2022). Uz sve navedeno, dolazi i do povećane proizvodnje citokina iz obitelji IL-17, kao što su IL-21, IL-22, IL-26, IL-17A i F, što dodatno pogoršava upalu i potiče oštećenje tkiva (McGeachy i sur., 2019).

Citokin IL-17A najbolje je istražen član obitelji citokina IL-17, a njegova potencijalna uloga kao biomarkera te terapijski potencijal predloženi su u kardio-metaboličkim poremećajima (Cortvrindt i sur., 2017 i Lavozi i sur., 2019). Učinci ovog citokina prepoznati su u posredovanju upale i remodeliranju ciljnih organa, uključujući različite funkcije, poput mobilizacije upalnih i imunoloških stanica (monocita, neutrofila i T limfocita) kroz disfunkcionalni endotel mikrocirkulacije, povećanu proizvodnju pro-upalnih molekula, kao što su citokini, kemokini i adhezijske molekule, indukciju degradacije izvanstaničnog matriksa i fibroze tkiva, te učinak aktivacije neutrofila i regulacije tkivnog tipa angiotenzina II (Cortvrindt i sur., 2017; Ma i sur.,

2019). Također je prepoznata uloga toga citokina u moduliranju metaboličke aktivnosti imunskih i neimunskih stanica, što je važno u homeostatskom održavanju tkiva i imunskog sustava te u reparaciji tkiva u patološkim stanjima (Bechara i sur., 2021).

1.10. Pretpostavljeni imunski mehanizmi u kroničnoj upali povezanoj s oštećenjem organa u kardio-metaboličkim bolestima

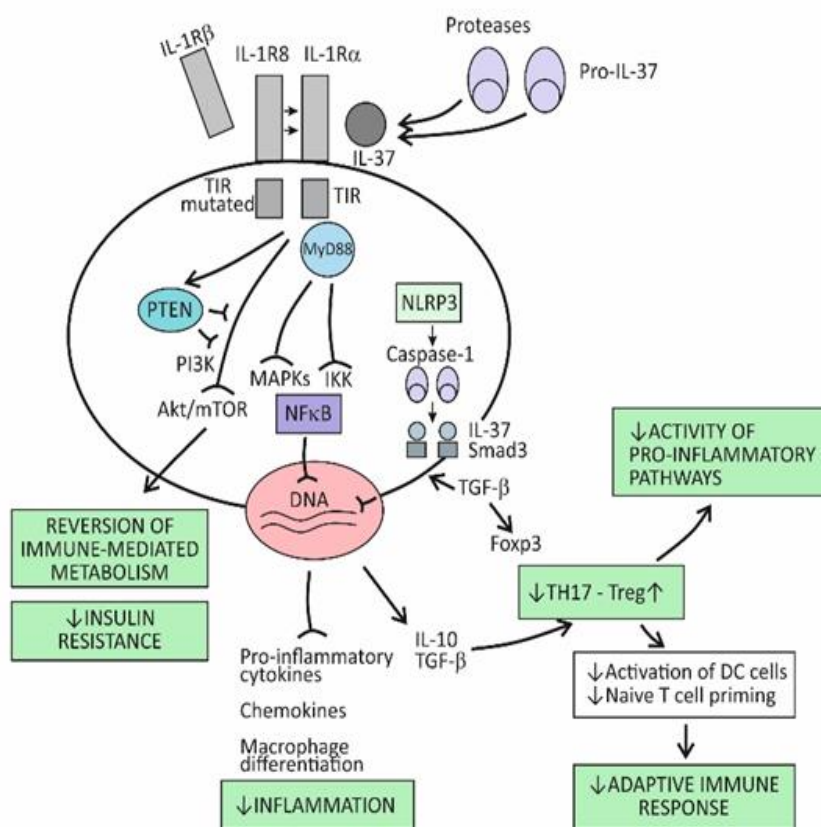
Imunološki mehanizmi odgovorni za razvoj međusobno povezanih bolesti, kao što se nalazi u kardio-metaboličkim stanjima, uključujući hipertenziju, metabolički sindrom i T2D, te kod sistemske autoimune bolesti su višestruki.

Uspostavljeni IL-23/IL-17A imunološki put, preko proizvodnje granulocita (neutrofila) i makrofaga putem svojih čimbenika poticanja rasta granulocitnih i granulocitno-makrofagnih kolonija (G-CSF i GM-CSF), odgovoran je za kontinuirano novačenje aktiviranih neutrofila u tkivo (povećana granulopoeza). Aktivirani neutrofili pomoću brojnih mehanizama dodatno doprinose oštećenju tkiva (Slika 4) (Araos i sur., 2020). Iako su se neutrofili tradicionalno smatrali protagonistima akutnog upalnog odgovora, sve je više dokaza da sudjeluju u kroničnoj upali u kontekstu oštećenja ciljnih organa povezanih s metaboličkim i vaskularnim stanjima povezanim sa starenjem. Primjerice, nakupljanje neutrofila promptno prati tkivnu ishemiju, a deplecija neutrofila dijelom prevenira tkivnu disfunkciju u ishemiji. Mehanizam oštećenja tkiva ostvaruju kroz otpuštanje velike količine proupalnih citokina, ROS te drugih proteolitičkih enzima i enzima oksidaze u okolno tkivo. Tkivni angiotenzin II (Ang II) djeluje sinergistički s IL-17A te potiče upalu tkiva i remodeliranje putem mehanizama kao što su mobilizacija imunoloških stanica, proizvodnja ROS-a i poticanje fibroze tkiva (Benigni i sur., 2010). U upalnom mediju ostale imunološke stanice i aktivirane rezidentne stanice također mogu proizvoditi IL-17A, čime se dodatno povećava upala (Zeng, C. i sur., 2012). Tkivna hipoksija (unutar upalnog infiltrata, u hiperplastičnom masnom tkivu, u neoplazmama, fibrozi i aterosklerotski promijenjenim organima) također suoblikuje mikrookoliš pogodan za diferencijaciju naivnih CD4+ T stanica u proupalne Th17 stanice, i to indukcijom Hif1, transkripcijskog čimbenika sa središnjom ulogom u glikolitičkom metabolizmu. Treg stanice i imunosupresivne mijeloidne stanice, poput M2 makrofaga, također su prisutne u hipoksičnim tkivima, pridonoseći prostornoj heterogenosti upalnog infiltrata koja u bitnoj mjeri određuje lokalni ishod upale. Konačni ishod ovih interakcija je slom lokalne regulacije (i destrukcija

tkivne arhitekture), ili imunološka ekskluzija, s pojavom tzv. imunoloških pustinja u tkivu. Protuupalni citokini i inhibicijske molekule koje dijeom luče FoxP3+Treg limfociti ključni su posrednici ovih zbivanja.

1.11. Mehanizmi protu-upalnog djelovanja citokina IL-37

Citokin IL-37 član je obitelji citokina IL-1, koja je poznata po svojoj ključnoj ulozi u poticanju upale (Dinarello CA, 2018). Za razliku od većine ostalih članova obitelji IL-1, IL-37 djeluje protu-upalno tako što suprimira produkciju pro-upalnih citokina, smanjuje sazrijevanje dendritičnih stanica i aktivaciju specifične imunosti. Postoje dva puta djelovanja toga citokina – izvanstanični i unutarstanični. Unutar stanice djelovanjem enzima kaspaze-1, koji su sastavni dio unutarstaničnog kompleksa - inflamiasoma, potiče se sazrijevanje prekusornog oblika IL-37 u zreli oblik, i stvara kompleks s proteinom Smad-3, te dalje suprimira prepisivanje gena za pro-upalne citokine i za aktivaciju dendritičnih stanica (Slika 5). Kada unutarstanične koncentracije zrelog oblika ovog citokina dosegnu neki prag, brzo se mogu otpustiti iz stanice na upalni podražaj u izvan-stanični prostor i ostvarivati svoje biološko djelovanje na okolnim stanicama. Prekusorske molekule IL-37, koje se nalaze u izvan-staničnom prostoru, cijepaju još nepoznate proteaze (možda porijeklom iz neutrofila) u zrele oblike koji imaju puno veću aktivnost. Nastali zreli oblici molekule citokina IL-37 u izvanstaničnom prostoru inhibiraju formiranje funkcionalno aktivnog receptorskog kompleksa za pro-upalni citokin IL-18 na površini stanica tako što interferiraju s citokinom IL-18 za receptorsku podjedinicu IL-18Ra. Nastali kompleks IL-18Ra/IL-37 se veže s konstitucijskim inhibitorom citokina IL-18, molekulom IL-18BP (IL-18 Binding Protein), čime se suprimira unutarstanično djelovanje citokina IL-18. Kompleks IL-18Ra/IL-37/IL-18BP smanjuje aktivnost adaptorske molekule MyD88 pri vezanju s receptorom TIR (Toll/IL-1R) te time inhibira fosforilaciju transkripcijskog čimbenika NFκB i produkciju pro-upalnih citokina, a također i putem aktivacije protu-upalnih puteva prenošenja signala - molekula, kao što su: STAT3, p62 i PTEN (Slika 5) (Yan i sur., 2019). IL-37 djeluje i na stečeni imunološki odgovor, tako što smanjuje ekspresiju molekula tkivne snošljivosti (MHC/HLA II) i CD40 na dendritičnim stanicama potrebnim za aktivaciju T-limfocita. Drugi važan mehanizam je poticanje razvoja spomenutih Treg stanica, čime smanjuje jačinu auto-imunih bolesti i kronične upale posredovane Th17-limfocitima (Slika 5) (Shevyrev i sur., 2020).



Slika 5. Imunosupresivni i metabolički učinak citokina IL-37

Preuzeto i prilagođeno prema Majnarić LT i sur., 2022.

1.12. Imunološka memorija u nespecifičnom imunosnom sustavu (eng. **Trained immunity**) i IL-37

Tradicionalno, urođeni i adaptivni imunološki sustav razlikuju se po svojoj specifičnosti i kapacitetu pamćenja. Do nedavno, imunološko pamćenje (sposobnost imunološkog sustava da bilježi i memorira učinkovitu obrambenu reakciju u ponovljenim susretima s istim mikroorganizmom) smatrala se isključivom značajkom adaptivnog imunološkog sustava (posredovanog T-stanicama) (den Haan i sur., 2014). Međutim, posljednjih godina ova se paradigma promijenila, i sve veći je broj dokaza, da stanice urođenog imunološkog sustava mogu dobiti karakteristike pamćenja nakon prolazne stimulacije, što rezultira pojačanim odgovorom na

sekundarni izazov (ponovljena stimulacija s infektivnim i neinfektivnim izazovima) (Bekkering i sur., 2013). Taj se fenomen naziva istrenirani imunitet, eng. *Trained immunity* (Netea i sur., 2016). Prema rezultatima transkripcijskih i epigenetičkih studija, oni geni na čiju aktivnost utječe trenirani imunitet su oni koji su uključeni u imunološke funkcije i stabilizaciju glikolitičkih metaboličkih putova (Zhang, S. i sur., 2021; Arts i sur, 2016).

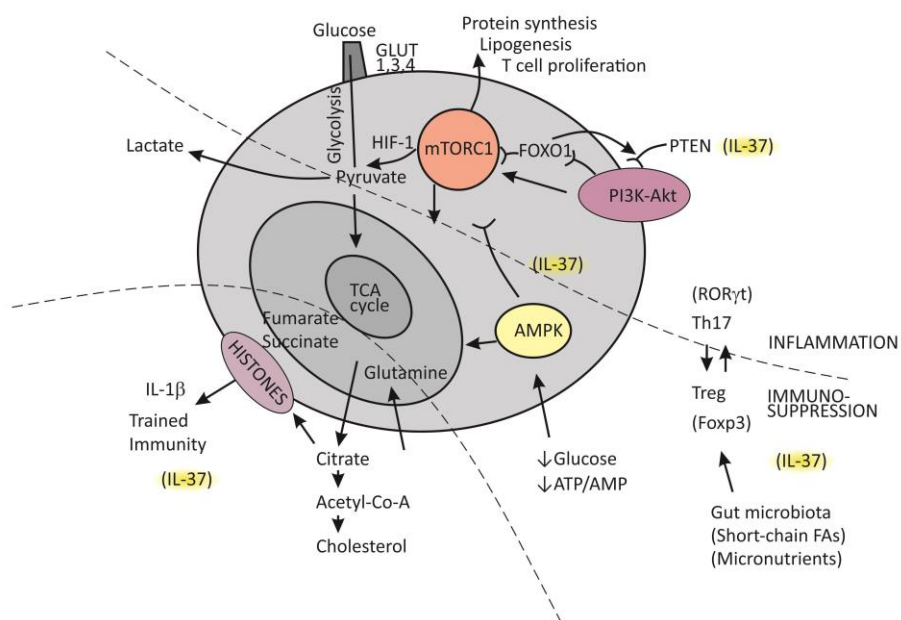
Ključni mehanizmi u osnovi treniranog imuniteta, uključuju ponovno usklađivanje staničnog metabolizma i indukciju posttranslacijskih modifikacija histona (epigenetske promjene). Ovi mehanizmi rezultiraju povećanom dostupnošću kromatina za upalne podražaje i dugotrajnim povećanjem proizvodnje proupalnih citokina. Bitan korak u procesu epigenetskog reprogramiranja je metaboličko reprogramiranje, tj. promjena metabolizma stanične energije s oksidativne fosforilacije na anaerobnu glikolizu pri sintezi adenozin-trifostafa (ATP)- Warburgov učinak) (Slika 6) (Brown i sur., 2020; Arts i sur., 2016). Taj se proces regulira aktiviranjem Akt/mTOR/Hif puta, što u konačnici rezultira povećanim stvaranjem laktata, acidifikacijom tkiva i poremećajem ciklusa limunske kiseline, trikarboksilne kiseline (CAC) ili Krebsovog ciklusa (Slika 6). Glavna svrha ovih metaboličkih promjena je ispuniti zahtjeve aktiviranih imunoloških stanica kako bi se brzo stvorio ATP, u kojem leži energija potrebna za izvršavanje funkcija imunoloških stanica i sintezu novih komponenti (Salmond i sur., 2018; Powell i sur., 2012).

Ukoliko se pak smanji aktivnost Krebsovog ciklusa, aktiviraju se alternativni metabolički putevi te povećava unutarstanična koncentracija drugih metabolita kao što su citrat, sukcinat i fumarat. Povećana dostupnost ovih metabolita, ubrzava modifikaciju histona i razvoj epigenetskih promjena (Slika 6) (Zhang i sur., 2021; Arts i sur, 2016).

Osim toga, promjene i u unutarstaničnim koncentracijama nusproizvoda aktivacije glikolitičkog metabolizma, kao što su slobodne masne kiseline, kolesterol i derivati kolesterola, također mogu imati ulogu u transdukciji staničnog signala, kroz proces promjene sastava stanične membrane i drugih staničnih struktura ili izravnim utjecajem na signalizaciju putova (Slika 6) (Salmond i sur., 2018; Powell i sur., 2012).

Do aktivacije mehanizama „Trained Immunity” dolazi u kroničnim upalnim stanjima kao što su metaboličke promjene tipa inzulinske rezistencije i metaboličkog sindroma. IL-37 dovodi do reverzije tih metaboličkih poremećaja, što se očituje smanjenjem aktivnosti unutarstaničnog

regulacijskog kompleksa mTOR i povećanjem aktivnosti AMP-kinaza. Upravo bolje razumijevanje pojma trenirane imunosti, te razumijevanje patofiziologije kroničnih upalnih bolesti, doveo je do saznanja da istrenirani imunitet može inducirati maladaptivne učinke i doprinijeti hiperinflamaciji, progresiji kardiovaskularnih bolesti, i neuroinflamacij. Stoga je konsenzus o definiciji treniranog imuniteta u *in vitro* i *in vivo* uvjetima, kao i na eksperimentalnim modelima i ljudskim subjektima, neophodan za napredak u ovom polju istraživanja.



Slika 6. Metaboličko reprogramiranje u kroničnoj upali

Preuzeto i prilagođeno prema Majnarić LT i sur., 2022.

1.13. Metaboličko reprogramiranje u kroničnoj upali i uloga u pomicanju ravnoteže između protu-upalnih i upalnih imunskih mehanizama

Starenje i redistribucija masnog tkiva, posebno u uvjetima povećane nutritivne, kalorijskog viška i pretilosti, izvor su upale i pokretač metaboličkih poremećaja povezanih sa starenjem, kao što su povećanje stupnja inzulinske rezistencije (smanjene osjetljivosti ciljnih tkiva na unošenje glukoze u stanice posredovanjem inzulina) i poremećaj homeostaze metabolizma glukoze. Obje stanične linije, i Th17 i Treg, izražavaju značajnu sposobnost prilagodbe uvjetima u mikrookolišu, kao i metaboličkim zahtjevima tkiva kako bi se održala funkcionalna stabilnost (Brown i sur., 2020).

Serin treonin kinaza (mTOR) ključni je regulator imunoloških funkcija (Slika 5) (Powell i sur., 2012). Kompleks mTOR sastavljen je iz različitih adapterskih proteina koji imaju različite sposobnosti. Tako varijanta mTORC1 ima ključnu ulogu u diferencijaciji naivnih Th stanica u podskupine efektorskih Th1 i Th17 stanica, dok mTORC2 signalizacija regulira diferencijaciju Th2 stanica (Salmond 2018). U stanju mirovanja naivne Th stanice koriste autofagiju kako bi osigurale dostatne aminokiseline za sintezu proteina, a proces oksidativne fosforilacije za održavanje energije (Barbi i sur., 2013). Aktivacija T stanica u stanju povećane upale, inzulinske rezistencije i ostalih metaboličkih poremećaja povezanih s procesom starenja, praćena je aktivacijom kompleksa mTORC1 kako bi se održalo glikolitičko metaboličko reprogramiranje (Salmond 2018). Također povećanje unutarstaničnog omjera ATP/AMP kao posljedica prebacivanja T stanica na glikolitički metabolizam potiskuje aktivaciju AMP-kinaze (AMPK), čime se štiti mTORC1 od inhibitorne aktivnosti ove kinaze (Blagih i sur., 2015) (Slika 6). Efektorske T-stanice, uključujući citolitičke CD8+ T-stanice i Th1, Th2 i Th17 CD4+ podskupine efektorskih stanica jako su ovisne o glikolitičkom metaboličkom reprogramiranju. Aktivirani signalni put PI3K-Akt uzvodno od mTORC1 povećava ekspresiju transportera glukoze (GLUT) čime se pojačava glikoliza i narušava ravnoteža Th17/Treg (Zhang i sur., 2021; Barbi i sur., 2013). Sve više je dokaza koji govore u prilogu plastičnosti Treg stanica, a vođeno je oscilacijama u metaboličkom programiranju (Zhang i sur., 2021; Barbi i sur., 2013).

Oštećenje signalnog puta PI3K/Akt, povećanje inzulinske rezistencije i oštećenje transporta glukoze i sinteze glikogena igraju ključnu ulogu u razvoju pretilosti i T2D. S druge strane poremećaji povezani s pretilošću i T2D, kao što su povećana proizvodnja SMK, unutarstanično taloženje lipida, disfunkcija mitohondrija i povećani oksidativni stres mogu dovesti do povećane

proizvodnje proupalnih citokina, i dodatno potaknuti inzulinsku rezistenciju djelujući na različite točke puta PI3K/Akt, osobito u skeletnim mišićima (Slika 6) (Rehman i sur., 2016). Navedeni poremećaji mogu promicati inzulinsku rezistenciju aktiviranjem stres kinaza (umjesto Akt kinaza), kao što je c-Jun N-terminalna kinaza (JNK) obitelji MAPK kinaza, i IKK kinaze, koje djeluju tako da inhibiraju transdukciju signala posredovanu inzulinom, i pokrećući inhibitornu serinsku fosforilaciju receptora za inzulin IRS-1. Kada se ovaj proces promatra iz globalnije perspektive, može se reći da poremećaji povezani s pretilošću stvaraju upalni mikrookoliš povezan s povećanim unutarstaničnim stvaranjem kompleksa inflammasoma, posebno uključujući tip NLRP3 inflammasoma i na taj način pojačavajući i urođeni imunološki odgovor kao i specifični imunološki odgovor, kako u tkivu, tako i na razini sustava (Meyers i sur., 2020; Vandanmagsar i sur., 2011).

1.14. Dosadašnja istraživanja o ulozi citokina IL-17A i IL-37 u kroničnoj upali povezanoj s oštećenjem organa u kardio-metaboličkim bolestima

Kao pokazatelji upalne aktivnosti u stanjima u kojima zbog prisustva KV rizičnih čimbenika dolazi do razvoja oštećenja ciljnih organa i vaskularnih komplikacija, sve više se istražuju i citokini IL-17A i IL-37, od kojih prvi ima pro-upalnu, a drugi protu-upalnu ulogu. U Tablici 1 i 2 vidljiv je prikaz dosadašnjih istraživanja o njihovoj ulozi.

Tablica 1. Dosadašnja istraživanja o ulozi citokina IL-17A vezanim za kardio-metaboličke bolesti

Autori	Značajnost istraživanja
Meng i sur., 2012.	Citokin IL-17A aktivira JAK2/STAT3 signalni put, koji se aktivira i pri razvoju fibroze i apoptoze jetrenih stanica.
Cortvrindt i sur., 2017.	Citokin IL-17A najbolje je istražen od obitelji citokina IL-17, a njegov dijagnostički i terapijski potencijal prepoznat je u kardio-metaboličkim bolestima.
Fest i sur., 2018.	Citokin IL-17A utječe na povećanu proizvodnju pro-upalnih molekula, ostvaruje učinak na indukciju degradacije izvanstaničnog matriksa i nastanak fibroze tkiva, kao i učinak na aktivaciju neutrofila i regulaciju tkivnog tipa angiotenzina II.
Schüler i sur., 2019.	Citokin IL-17A u kardiovaskularnom sustavu utječe na razinu upale i remodeliranje ciljnog tkiva organa djelujući na više različitih razina.
Bechara, i sur. 2021.	Citokin IL-17A ima ulogu u poticanju fibroznih procesa, prvenstveno kroz indukciju fibroznog faktora TGF-b.
Qiu i sur., 2021.	Citokin IL-17A sudjeluje u patofiziologiji oštećenja bubrežnog tkiva u sklopu dijabetičke nefropatije.
Trtica Majnarić L, i sur. 2021.	Citokin IL-17A potiče produkciju pro-upalnih citokina i drugih medijatora upale u ciljnim stanicama ili pojačava pro-upalni učinak drugih citokina, izraženo kroz varijacije u omjeru NLR kada se koristi kao marker upale kod KVB.

Tablica 2. Dosadašnja istraživanja o ulozi citokina IL-37 vezanim za kardio-metaboličke bolesti

Autor	Značajnost istraživanja
Dinarelo i sur., 2016.	Citokin IL-37 se pokazao kao supstanca s visokim terapijskim potencijalom u T2D i KVB.
Shou X, i sur., 2017.	Citokin IL-37 se pokazao kao prediktor loše prognoze u bolesnika s dijagnozom kroničnog srčanog zatajenja.
Yan i sur., 2019.	Povećana produkcija IL-37 utvrđena je u brojnim vaskularnim i kardio- metaboličkim stanjima (akutni infarkt miokarda, ateroskleroza, aortalna kalcifikacija, arterijska hipertenzija, proliferativna dijabetička retinopatija).
López-Bautista i sur., 2020.	Citokin IL-37 je protuupalni citokin uključen u regulaciju homeostaze kolesterola, smanjujući razine kolesterola u plazmi, masnih kiselina i triglicerida.
Zhang X, i sur., 2020.	Citokin IL-37 smanjuje oštećenje stanica podocita izazvano povećanim stupnjem upale i oksidacijskog stresa uslijed hiperglikemije u osoba s T2D čime se potiče protektivni učinak na razvoj i progresiju dijabetičke nefropatije.
Zhang S, i sur., 2021.	Citokin IL-37 suprimira proizvodnju proupalnih citokina, potiče reverziju inzulinske rezistencije, suprimira adaptivni imunološki odgovor te promiče razvoj Treg limfocita.
Mountford i sur., 2021.	Smanjena proizvodnja citokina IL-37 povezana je s pojačanom fibrozom tkiva.
Cavalli G, i sur. 2021	Citokin IL-37 je protuupalni citokin koji suzbija upalu i modulira metabolički put (djeluje na obnavljanje homeostaze i smanjenje metaboličke potrošnje u kroničnoj upali).
Bosnić Z, i sur., 2023.	Zbog visoke heterogenosti starijih bolesnika s T2D, dolazi do razlike u serumskim vrijednostima citokina IL-37, zbog čega postoje ograničenja u korištenju klasičnih pristupa određivanja dijagnostičke i prognostičke korisnosti IL-37 u T2D.

1.15. Dijabetes tipa 2 kao heterogena kompleksna bolest (povezanost sa starenjem, s nastankom multimorbiditeta)

T2D se smatra heterogenim poremećajem, što znači da se osobe s dijagnozom te bolesti znatno međusobno razlikuju po poremećajima koje imaju, a i po stupnju rizika za nepoželjne zdravstvene ishode (Cuschieri 2019). Uz već poznatu činjenicu da se rizik nastanka makro- i mikro-vaskularnih komplikacija i smrti povećava s trajanjem i lošom regulacijom T2D, noviji dokazi ukazuju i na važnost dobi pacijenta te dobi u kojoj je T2D nastao (Dinarello 2018). T2D je pretežito bolest starije životne dobi s naglijim porastom incidencije nakon 50-te god. života. Ta činjenica dodaje na kompleksnosti T2D, budući da su čimbenici koji se i inače povezuju sa starenjem, kao što su povećani stupanj komorbiditeta, veća ovisnost regulacije glukoze u krvi o komorbiditetu, kao i sklonost razvoju sarkopenije (gubitka mišićnog tkiva), malnutricije i stanja krhkosti (tjelesne nemoći) (eng. *Frailty*), još više izraženi u osoba s tom bolešću, a neto-učinak svih poremećaja u pojedine osobe odražava se na vrijednosti laboratorijskih parametara (Cavalli i sur., 2021). Primjena novih antidijabetičkih lijekova, u zadnjih godina, čini se da djeluje na smanjenje rizika od KVB i dijabetičkog oštećenja bubrega, što može modificirati tijek T2D. Zbog te heterogenosti osoba s dijagnozom T2D, analiza razlika u serumskoj koncentraciji pojedinih upalnih biljega u presječnim studijama, često daje proturječne rezultate (Roden i sur., 2019).

1.16. Primjena metode klasteriranja podataka i naprednih molekularno-bioloških i kompjuterskih tehnologija (sistemske-biološkog pristupa) u ispitivanju heterogenosti osoba oboljelih od dijabetesa tipa 2

Jasno je da je T2D heterogena bolest te da se osobe s dijagnozom te bolesti međusobno razlikuju po kliničkoj prezentaciji, tijeku bolesti i odgovoru na pojedine oblike liječenja (McCarthy 2017). Budući da je to multifaktorijska bolest (svaki čimbenik s malim utjecajem na ekspresiju bolesti) uz veliki utjecaj vanjskih, promjenjivih čimbenika, te da su molekularni patofiziološki putevi razvoja bolesti slabo poznati, kao i njihova povezanost s rasponom i dinamikom nastanka oštećenja organa, danas se pribjegava istraživanju heterogenosti T2D sistemske-biološkim pristupom (Ahlqvist i sur., 2018; Wesolowska-Andersen i sur., 2022). To je holistički pristup istraživanju (za razliku od tradicionalnog redukcionističkog pristupa), jer nastoji integrirati, putem računalnog modeliranja, veći broj podataka koji opisuju kliničke osobine osoba s T2D s

biokemijskim i molekularno-biološkim podacima (dobivenih npr. analizom genoma ili transkriptoma). Neke od novih tehnologija, kao što su sekvenciranje jednostanične DNK ili RNK, skupa s naprednim kompjuterskim tehnikama obrade podataka, pokazuju do sada neslućene mogućnosti pružanja uvida u povezanost patologije na razini pojedinih tkiva i organa s kliničkom ekspresijom bolesti (Wu i sur., 2021).

2. HIPOTEZE

- 1) Citokini IL-17A i IL-37, zbog uloge u regulaciji upale, bolji su prediktori vaskularnih komplikacija i drugih nepovoljnih stanja u osoba s dijagnozom dijabetesa tipa 2 (T2D), nego omjer neutrofila i limfocita, danas najviše korišten upalni biljeg u kliničkim istraživanjima.
- 2) Citokini IL-17A i IL-37 povezani su s obilježjima osoba s T2D koja opisuju vaskularne komplikacije i druga prognostički nepovoljna stanja.
- 3) Citokini IL-17A i IL-37 povezani su i međusobno, zbog svoje uloge u patofiziološkim procesima povezanim s kroničnom upalom.
- 4) Klasteriranje upalnih biljega sa sociodemografskim i kliničkim obilježjima omogućuje bolje razumijevanje faza kronične upale povezane s oštećenjem organa i vaskularnim komplikacijama u osoba s T2D.

3. CILJEVI

Ciljevi istraživanja bili su sljedeći:

- 1) Odrediti distribuciju vrijednosti citokina IL-17A i IL-37 u ispitanika
- 2) Utvrditi obilježja ispitanika s kojima su ti citokini povezani
- 3) Utvrditi stupanj povezanosti između tih citokina i između njih i standardnih upalnih biljega
- 4) Utvrditi optimalne granične vrijednosti tih citokina i njihovu razdjelnu moć za vaskularne komplikacije i druga nepovoljna stanja ispitanika te je usporediti s onom standardnih upalnih biljega i pojedinih kombinacija upalnih biljega
- 5) Utvrditi optimalni broj i obilježja fenotipskih podskupina koje se mogu prepoznati u ispitanika
- 6) Interpretirati obrazac promjena upalnih biljega između fenotipova, a u okviru kliničkog konteksta predstavljenog fenotipovima

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj istraživanja

Istraživanje je ustrojeno kao presječno istraživanje. Provedeno je u 4 ambulante opće/obiteljske pri Domu zdravlja Slavonski Brod (DZSB) u Slavonskom Brodu dok je laboratorijsko ispitivanje provedeno na Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu te Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku u KBC Osijek, Odjelu za imunološku i alergološku dijagnostiku.

4.2. Ispitanici

U istraživanje su uključeni ambulantni pacijenti, tj. oni koji samostalno dolaze izabranom obiteljskom liječniku. Uključujući čimbenici su pacijenti oba spola, u dobi od 50 godina i više, koji boluju od šećerne bolesti tip 2. Isključujući čimbenici su pacijenti oboljeli od autoimunih bolesti, malignih bolesti, u tijeku aktivnog onkološkog liječenja, na kroničnom programu hemodijalize, pacijenti s amputiranim udovima, oboljeli od uznapredovalih neurodegenerativnih bolesti te pacijenti s akutnom bolesti zbog koje će u istom vremenskom periodu posjetiti izabranog liječnika. Odabir dobne granice temeljio se na postojećem znanju o najčešćoj dobi pojave pretilosti, metaboličkog poremećaja i T2D, a za koju je uočena i veća pojavnost multimorbideta (dvije ili više kronične bolesti skupa) (Kraja i sur., 2006; Singh-Manoux i sur., 2018) Sagledavši sve uključujuće i isključujuće čimbenike, za uočavanje srednjeg efekta u razlici numeričkih varijabli između četiri nezavisne skupine ispitanika, uz razinu značajnosti od 0.05 i snagu 0.8, izračunata je minimalna potrebna veličina uzorka, koja bi trebala iznositi 180 ispitanika (G*Power, 3.1.9.4.; <https://gpower.software.informer.com/3.1>).

Probir ispitanika vršio se redom dolaska u ambulantu i usmenim pozivanjem, sve dok se nije dostigla potrebna veličina uzorka. Prilikom posjete ispitanici su upoznati od strane glavnog istraživača o prirodi i tijeku istraživanja kao i znanstvenom doprinosu za potrebe izrade doktorskog rada. Također, svi su ispitanici dobili i dokument obaviještenosti – obrazloženja studije te potpisali informativni pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Za istraživanje je dobivena Suglasnost Etičkoga povjerenstva DZSB, broj: 1433-1/020. Istraživanje je provedeno u razdoblju od četiri mjeseca, od rujna do prosinca 2020. godine.

4.3. Materijali i metode

4.3.1. Ispitivanje sociodemografskih podataka i kliničkih obilježja pacijenata te testovi probira

Podaci o kroničnim bolestima korišteni su iz računalnog programa medicinskog kartona i putem intervjua s pacijentima. Ispitivani parametri su: dob, spol, dijagnoze kroničnih bolesti prema MKB klasifikaciji bolesti (prema 10. reviziji Međunarodne klasifikacije bolesti i srodnih stanja, ICD-10 (eng. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision), podatak o ukupnom i specifičnom broju lijekova u kroničnoj terapiji, te podatak o pušenju.

Prilikom posjete izmjerene su antropometrijske mjere, kao tradicionalni pokazatelji stanja uhranjenosti, metaboličkih poremećaja i mišićne mase u osoba starije dobi: indeks tjelesne mase, BMI (eng. *Body Mass Index*) - mjera opće pretilosti, obujam struka - mjera abdominalne pretilosti i obujam srednjeg dijela nadlaktice (eng. *Mid arm muscle circumference*) - mjera gubitka mišićne mase ili sarkopenije (Bohannon i sur., 2016; Kuo i sur., 2020).

Za potrebe ispitivanja sindroma krhkosti, korišten je Friedov fenotipski model, kao najviše primjenjivan instrument u istraživanjima. Navedeni instrument temelji se na određivanju pet kriterija, a to su nenamjerni gubitak na tjelesnoj težini, osjećaj umora (iscrpljenosti), smanjena tjelesna aktivnost, smanjena brzina hoda (mjerena na 4-metarskoj stazi) te smanjena jačina stiska šake, mjerena dinamometrom (JAMAR, Nottinghamshire, UK). Broj bodova 1 – 2 označava predstadij tjelesne slabosti (eng. *Pre-frailty*), dok broj bodova 3 – 5 označava razvijeno stanje tjelesne slabosti (eng. *Frailty*) (Fried i sur., 2001).

Nutricijski status ispitan je putem MNA testa (eng. *Mini Nutritional Assessment*). Test MNA-SF (eng. *Mini Nutritional Assessment - Short Form*) je široko korišten alat probira kreiran za ispitivanje stanja uhranjenosti starijih osoba, bilo onih hospitaliziranih, smještenih u domovima za starije ili onih koji neovisno žive u zajednici. Test se temelji na bilježenju BMI, unosa hrane, gubitka na tjelesnoj masi u posljednja tri mjeseca, stupnju pokretljivosti te prisutnosti psihološkog stresa u zadnja tri mjeseca. Jednostavan je, sveobuhvatan te se pokazao kao jedan od najprikladnijih testova alata probira u istraživanjima na razini primarne zdravstvene zaštite. MNA-SF se sastoji od 6 pitanja koja se boduju od 0 do 3. Ukupni zbroj od 12 do 14 predstavlja

normalnu uhranjenost, od 8 do 11 predstavlja rizik za pothranjenost, dok ukupan zbroj bodova 7 i manje ukazuje na pothranjenost (Kaiser i sur., 2009; Lorenzo-López i sur., 2017.).

Kako bismo utvrdili imaju li ispitanici kriterije za metabolički sindrom (MS), korišteni su modificirani kriteriji NCP ATP III (eng. *National Cholesterol Education Program Expert Panel (NCEP) and Adult Treatment Panel III (ATP III)*) (Huang 2009). Kao što dokazi sugeriraju, dijabetičari s MS imaju veću predispoziciju za razvoj KV komplikacija nego oni bez MS-a (Zadhoush i sur. 2015).

Modificirani kriteriji NCP ATP III za definiciju metaboličkog sindroma : ≥ 2 od sljedećeg:

- obujam struka ≥ 102 cm (88 cm za Ž),
- TG $\geq 1,7$ mmol/L
- HDL $< 1,0$ mmol/L (1,2 za Ž)
- Dijagnoza arterijske hipertenzije

Bubrežna funkcija procijenjena je iz serumske razine kreatinina, putem online kalkulatora i jednadžbe Modifikacije prehrane kod bubrežne bolesti (MDRD). Procijenjena je brzina glomerularne filtracije (eGFR), a za potrebe izračuna korišteni su podaci o spolu, dobi, rasnoj pripadnosti i vrijednostima serumskog kreatinina (Levey i sur., 2021).

Formula za računanje glasi MDRD eGFR = $186 \times \text{Serum Cr (mg/dL)}^{-1.154} \times \text{spol}^{-0.203} \times 1.212$ (važno za pacijente crne rase) $\times 0.742$ (važno za pacijentice).

Postoje 4 stupnja slabljenja bubrežne funkcije, pri čemu su 1. i 2. stupanj povezani su s očuvanom funkcijom, a razine 3 (30 do 60 ml/min/1.73m²) i 4 (15 do 29 ml/min/1.73m²) sa smanjenom bubrežnom funkcijom.

Za procjenu kontrole dijabetesa korišten je marker HbA1c, za koji većina društava preporuča vrijednosti 6,5 – 8 %, naročito u starijih osoba s potvrdom T2D i pridruženim komorbiditetima, iako se i dalje naglasak stavlja na individualizirani pristup (Buse i sur., 2020; American Diabetes Association 2022).

Među laboratorijskim analizama, analiziran je i tireostimulirajući hormon (TSH). Varijacije u vrijednostima TSH mogu otkriti latentnu hipotireozu te disregulaciju osovine hipotalamus-

hipofiza-štitnjača. Poznato je da je TSH uključen u metaboličke i kardiovaskularne poremećaje kod starijih osoba, naročito u stanjima s prisutnošću više komorbiditeta (Barbesino 2019). Razine TSH u rasponu od 4-10 mU/L ukazuju na latentnu primarnu hipotireozu (uz uredan serumski tiroksin), često stanje u bolesnika s dijabetesom koje utječe na metaboličke poremećaje (Han i sur., 2015).

4.3.2. Laboratorijsko ispitivanje

Za potrebe laboratorijske obrade, korišteni su uzorci krvi dobiveni venepunkcijom u jutarnjim satima (od 06:30 do 07:30h) kada su ispitanici bili natašte. Ispitanicima je vađena krv iz kubitalne vene u epruvetu s crvenim čepom bez aditiva za dobivanje seruma (BD Vacutainers Systems, Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK) na Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku Opće bolnice „Dr. Josip Benčević“ u Slavonskom Brodu. Za potrebe analize uzimalo se 10 ml venske krvi (2 epruvete) nakon čega su se serumske epruvete ostavljale 30 minuta u uspravnom položaju na sobnoj temperaturi sve dok se ugrušak u potpunosti oblikuje. Potom su uzorci centrifugirani tijekom 10 minuta na 3000 okretaja u minuti (Hettich Rotina 380 R, Tuttlingen, Njemačka). Nakon odvajanja seruma od stanica, dalje je alikvotiran i pohranjen do analize na temperaturi od -20 °C u vremenskom okviru od 45 minuta nakon venepunkcije. Uzorci su analizirani tijekom razdoblja od četiri tjedna. Nakon obrade periferne krvi, dio seruma je pohranjen na temperaturi -70°C za potrebe mjerenja citokina, IL-17A i IL-37 koji su analizirani u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku u KBC Osijek, Odjelu za imunološku i alergološku dijagnostiku.

4.3.2.a. Ispitivanje hematoloških parametara

Pretrage kompletne krvne slike izvedene su rutinskom analizom na hematološkome brojaču Sysmex XN 1000 (SYSMEX UK LTD, Wymbush, Milton Keynes, GB). Analitički sustav određuje 26 hematoloških parametara pri čemu se broj leukocita, broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, broj trombocita, srednji volumen eritrocita (MCV), srednji volumen trombocita, postotak retikulocita direktno mjere. Ostali parametri kao što su hematokrit (HCT), srednji srednji sadržaj hemoglobina u eritrocitu (MCH), predstavlja srednja koncentracija hemoglobina u eritrocitu (MCHC) kao i apsolutni broj leukocitnih populacija izračunavaju se iz podataka o izmjerenim veličinama. Analitička jedinica koristi Coulterovu metodu po načelu impedancije i volumetrijskog brojenja krvnih stanica. Razrijeđena suspenzija stanica prolaskom kroz strujni krug izaziva promjene otpora koji izazivaju promjene napona što se bilježi detektorima, a nastali

signali se prevode u električne impulse koji se broje. Količina volumena izotonične elektrolitne otopine (diluenta) koju stanice istisnu svojim prolaskom, analogna je veličini električnog impulsa proporcionalnog staničnom volumenu. Iz kompletne i diferencijalne krvne slike izračunat je omjer neutrofila i limfocita (NLR), kao jednog od biomarkera kronične upale koji bolje odražavaju kroničnu upalu povezanu s tkivom.

4.3.2.b. Ispitivanje biokemijskih parametara

Ispitivanje biokemijskih parametara izvedeno je na automatiziranom analizatoru DxC 700AU (Beckman Coulter, Fullerton, SAD). Vrijednosti aspartat amino-transferaze (AST) i alanin amino-transferaze (ALT), analizirane su kinetičkom spektrofotometrijskom UV metodom bez dodatka piridoksal fosfata. Vrijednosti gama-glutamiltransferaza (GGT) analizirane su fotometrijskom IFCC (eng. *International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory medicine*) metodom. Za potrebe određivanja ukupnog kolesterola, LDL kolesterola, triglicerida (TG) i HDL-kolesterola korištena je enzimski test bojanja. Vrijednosti glukoze na tašte analizirane su enzimskim UV testom (metodom enzimske heksokinaze), dok su vrijednosti HbA1C analizirane su turbidimetrijskom metodom. Enzimska metoda korištena je i za analizu serumskog kreatinina. Vrijednosti CRP-a su analizirane imunoturbidimetrijskom metodom.

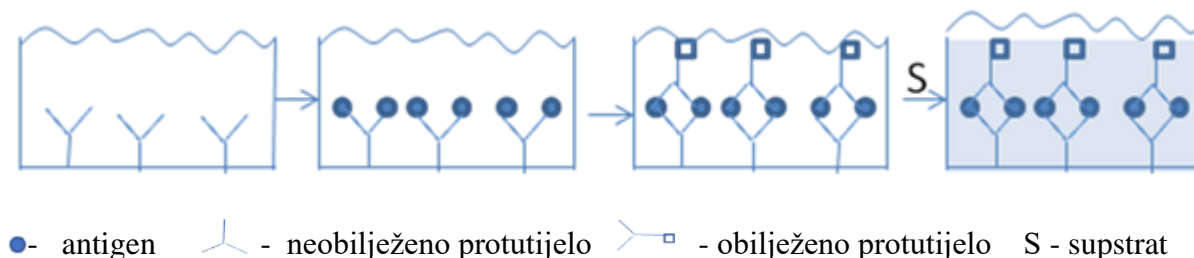
Vrijednosti TSH analizirane su kemiluminiscentnim imunotestom s mikročesticama na analizatoru Alinity, Architect (Abbot Laboratories, Abbot Park, IL 60064, SAD).

4.3.3. Enzimski imunotest- Sendvič ELISA test

Enzimski test koji se često upotrebljava za analizu serumskih protutijela je ELISA (od eng. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Ovisno o načinu izvođenja, razlikujemo nekoliko inačica metode ELISA: indirektni ELISA test, sendvič ELISA test i kompeticijski ELISA test (Kohl i sur., 2017.).

Sendvič ELISA test je enzimski test, koji se često koristi za analizu izlučenih citokina, kao mjera funkcije limfocita T. U jažice se najprije imobiliziraju monoklonska protutijela koja specifično vežu epitope određenog citokina. Potom se uzorak seruma inkubira s vezanim protutijelima, te zatim ispiru iz jažica. U nastavku se dodaje sekundarno, enzimom obilježeno protutijelo koje prepoznaje neki drugi epitop koji sadržava citokin vezan za primarno protutijelo.

Vezani se citokin, dakle, nalazi u sendviču između dvaju protutijela, a njegovu prisutnost odaje pojava obojenja nakon dodatka supstrata (Slika 7) (Kohl i sur., 2017).



Slika 7. Sendvič ELISA test

Preuzeto i prilagođeno prema Ljiljana Trtica Majnarić, 2018.

4.3.4. Određivanje serumske koncentracije IL-17A i IL-37

Koncentracija IL-17A i IL-37 u serumu određena je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku u KBC Osijek, Odjelu za imunološku i alergološku dijagnostiku, nakon primarne obrade periferne krvi za potrebe hematološke i biokemijske obrade, za čije potrebe je krv skladištena na - 70 °C budući da se radi o citokinima koji dosta nestabilni. Za potrebe analize citokina korištena je sendvič ELISA metoda (eng. *Enzyme linked immunosorbent assay*), uz poštivanje protokola proizvođača reagensa. Za potrebe analize citokina korišteni su komercijalni kitovi:

IL-37 Human Uncoated ELISA kit, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, SAD

IL-17A (homodimer) Uncoated ELISA kit, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, SAD

4.3.4.a. Opis ELISA metode za određivanje serumske razine IL-17A

Prvog dana, ELISA ploča obložena je pročišćenim IL-17A monoklonskim antitijelom (IL-17A (homodimer) Uncoated ELISA kit, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, SAD, kataloški broj: 88-7176-88), u puferu za oblaganje i inkubirana tijekom noći na 4 °C. Drugog dana, ploča je isprana 3 puta i jažice su blokirane s fosfatnim puferom (0,01M PBS puferom koji je sastava 137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl), pH 7,4, 10% BSA i 0,05% eng. *Tween detergent*) i 10 % BSA, inkubirane na sobnoj temperaturi tijekom sat vremena na tresilici za mikroploče (Thermoshake inkubator shaker (Gerhardt Analytical Systems, Njemačka). Ploča je

isprana pet puta i na ploču su dodani standardi i u omjeru 1:2 razrijeđeni uzorci, nakon čega je ploča pokrivena i inkubirana na 4 °C preko noći za maksimalnu osjetljivost. Trećeg dana, ploča je isprana za ukupno pet ispiranja, a protutijelo za detekciju je konjugirano s biotinom i dodano u sve jažice ploče. Dalje je ploča pokrivena i inkubirana na sobnoj temperaturi na tresilici tijekom jednog sata. Nakon inkubacije, ploča je isprana pet puta i u sve jažice je dodana peroksidaza hrena (HRP) s avidinom, zatim je ploča pokrivena i inkubirana na sobnoj temperaturi na tresilici tijekom 30 minuta. Nakon inkubacije, ploča je isprana za ukupno sedam ispiranja i otopina supstrata s tetrametilbenzidinom (TMB) je dodana u sve jažice. Zatim je ploča inkubirana tijekom 15 minuta na tresilici za mikroploču na sobnoj temperaturi u mraku. Reakcija je zaustavljena s 1M fosfornom kiselinom. Apsorbancije su mjerene na 450 nm na ELISA procesoru EtiMax 3000, DiaSorin, Saluggia, Italija. Konstruirana je standardna krivulja i izračunata je koncentracija IL- 17A. Zbog razrjeđenja uzorka 1:2, rezultati su pomnoženi s faktorom 2.

4.3.4.b Opis ELISA metode za određivanje serumske razine IL-37

Prvog dana, ELISA ploča obložena je pročišćenim IL-37 monoklonskim antitijelom (Human Uncoated ELISA kit, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, SAD, kataloški broj: 88-52103) u puferu za oblaganje i inkubirana tijekom noći na 4°C. Drugog dana, ploča je isprana dva puta i jažice su blokirane s fosfatnim puferom (0,01M PBS puferom koji je sastava 137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl), pH 7,4, 10% BSA i 0,05% eng. *Tween detergent*) i 10 % BSA (Blocker™ BSA (10X) te potom inkubirane tijekom noći na 4°C. Trećeg dana ploča je dvaput isprana, a na ploču su dodani standardi i u omjeru 1:2 razrijeđeni uzorci. Zatim su u sve jažice dodana antitijela za detekciju konjugirana s biotinom. Nakon toga je ploča pokrivena i inkubirana tijekom 2 sata na sobnoj temperaturi na tresilici za mikroploče (Thermoshake incubator shaker, Gerhardt Analytical Systems, Njemačka). Dalje je ploča isprana ukupno četiri puta i u sve jažice je dodana peroksidaza hrena (HRP) sa streptavidinom, nakon čega je dalje ploča pokrivena i inkubirana na sobnoj temperaturi na tresilici tijekom jednog sata. Nakon 1 sata, ploča je isprana za ukupno četiri ispiranja, a otopina supstrata s tetrametilbenzidinom (TMB) je dodana u sve jažice. Dalje je ploča inkubirana tijekom 15 minuta na tresilici za mikroploču na sobnoj temperaturi u mraku. Reakcija je zaustavljena s 1M fosfornom kiselinom. Apsorbancije su mjerene na 450 nm na ELISA procesoru EtiMax 3000,

DiaSorin, Saluggia, Italija. Konstruirana je standardna krivulja i izračunata je koncentracija IL-37 ispitanika. Zbog razrjeđenja uzorka 1:2, rezultati su pomnoženi s faktorom 2.

4.3.5. Statističke metode

Deskriptivna statistika. Kategorijski podatci su predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama, a numerički podatci, ovisno o tipu raspodjele (normalna ili ne), aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, odnosno medijanom i interkvartilnim rasponom. Za ispitivanje normalnosti raspodjele podataka korišten je Shapiro test normalnosti (raspodjela nije slijedila normalnu, ako $p < 0.05$). Razlike u mjerenim obilježjima prema kvartilama vrijednosti upalnih biljega IL-17A i IL-37. Za numeričke varijable s normalnom raspodjelom, korištena je jednosmjerna analiza varijance ANOVA metoda, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele, Kruskal-Wallis (KW) rank sum test. Razlikovanje u značajnim numeričkim varijablama između parova kvartilnih skupina pojedinog upalnog biljega (ako je $p < 0.05$), testirano je primjenom odgovarajućih post hoc testova (Tukey-ev ANOVA post hoc test ili Dunn-ov KW post hoc test s Bonferonijevom korekcijom p-vrijednosti). Za kategorijske varijable, te razlike su ispitivane primjenom hi-kvadrat (χ^2) testa, a u slučaju frekvencije manje od 5, korišten je Fisher-ov egzaktni test.

Povezanost između pojedinih upalnih biljega je ispitana primjenom jednostavne korelacijske analize (Spearman) i višestruke (multinomijalne) logističke regresijske analize. To je model koji uspoređuje više skupina ispitanika istovremeno. Najniža kvartila (kvartila 1) korištena je za usporedbu (kontrolu). Razina značajnosti postavljena je na $p = 0.05$. Algoritam sam izabire varijable koje pokazuju značajnu povezanost ($\Pr(>|z|) < 0.05$). Indeks AIC (eng. *The Akaike information criterion*) je uzet kao mjera prediktivne performance modela. Analiza povezanosti između mjerenih obilježja i upalnih biljega IL-17A i IL-37 testirana je primjenom multinomijalne logističke regresijske analize. Izračunavanje optimalnih graničnih vrijednosti pojedinih upalnih biljega za određene podskupine pacijenata s T2D (npr. s KV bolestima, s nižim eGFR, s metaboličkim sindromom) je rađeno pomoću funkcije “cutpointr“, preuzete iz R-statističkog paketa, koja uzima sumu mjera osjetljivost i specifičnost da bi maksimizirala metričku (razdjelnu) funkciju. Za testiranje razdjelne moći (prediktivne vrijednosti) graničnih vrijednosti (eng. *Cut-off*) pojedinih biljega upale i njihovih kombinacija između dvije podskupine pacijenata s T2D, korištena je metoda ROC krivulja (eng. *Receiver Operating Characteristic Curves*) koja

je evaluirana pomoću AUC (eng. *Area Under Curve*) metrike, koja označava veličinu površine ispod krivulje, a poznata je kao c-statistika. Test DeLong je korišten za usporedbu razlika između dvije AUC površine u modelu (uz $p \leq 0.05$). Razvrstavanje upalnih biljega s odabranim sociodemografskim i kliničkim pokazateljima u skupine prema sličnosti (klaster), izvršeno je primjenom metode k-srednjih vrijednosti, preuzetog iz WEKA 3.9.5 analitičkog paketa. Taj algoritam pripada u tzv. nenadgledane (eng. *unsupervised*) metode strojnog učenja, što znači da zavisna varijabla nije prethodno definirana. Metoda je pogodna za traženje nepoznatih fenotipova u podacima. Klaster čini skupina podataka (ili osoba) koje su slične jedna drugoj (na temelju mjere “Euklidove udaljenosti”), a razlikuju se od podataka u drugom klasteru. Pri tome je pogreška između središta klastera i pojedinačnih vrijednosti podataka koji ulaze u klaster minimalizirana. Broj klastera (k) treba biti unaprijed određen. Postoji povezanost između broja klastera i prediktivne vrijednosti modela. Budući da nema točnog kriterija za odabir “najtočnije” K-vrijednosti, korisnik “k-means” algoritma (informatičar) ponavlja klaster-analizu, izrađujući više modela koji se razlikuju po broju klastera te promatra dobivene modele i odabire onaj koji mu se čini najprikladniji za interpretaciju. Pri tome se također uzimaju u obzir rezultati klaster-analize, kao što su ukupni zbroj kvadriranih pogrešaka u klasterima (eng. *The sum of squared errors*) i vrijeme potrebno da se izvrši klaster-analiza.

Za potrebe te analize, odabrana je skupina od 28 ulaznih varijabli te su prikazane njihove distribucije tako da su za numeričke varijable prikazani rasponi vrijednosti, tj. od min-max vrijednosti, a za kategorijske varijable su prikazane njihove relativne frekvencije po pojedinim definiranim kategorijama. Klaster-analiza je ponavljena s vrijednosti “k” 3-6 te je pokazala da se pogreška modela smanjuje s povećanjem broja klastera. U rezultatima je prikazan model sa 6 klastera.

Da bi se dodatno potvrdila povezanost između nezavisnih (ulaznih) varijabli i zavisne (izlazne) varijable – pokazatelja kronične upale u organima, korištena je multivarijatna linearna regresijska analiza, s varijablama NLR, IL-17A i IL-37, kao izlaznim varijablama.

5. REZULTATI

5.1. Sociodemografski podaci

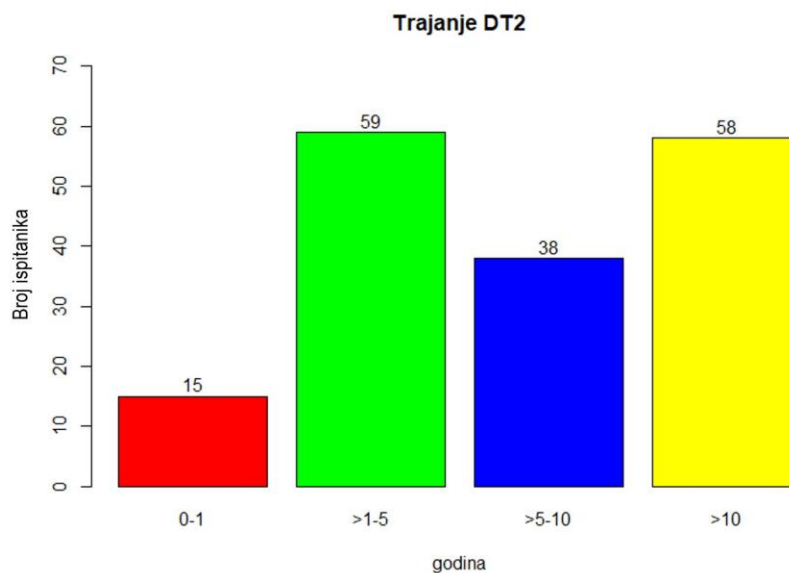
U istraživanje je bilo uključeno 170 ispitanika, pri čemu je većina ispitanika bila u dobi od 50 do 75 godina, i nešto veći broj odnosio se na muškarce u odnosu na žene. Manje od polovice imalo je dijagnosticiran T2D unutar 5 godina (0-5), dok je više od polovice ispitanika imalo T2D dulje od 5 godina (>5 godina) (Tablica 3) (Slika 8). Većina sudionika imala je dijagnosticiranu arterijsku hipertenziju dulje od pet godina, a gotovo polovica bolovala je od hipertenzije dulje od deset godina (Slika 9). Značajan udio ispitanika imao je izraženu prekomjernu tjelesnu težinu/pretilost, pri čemu se ističe abdominalni (visceralni) tip pretilosti, a što odražava i visok udio onih s metaboličkim sindromom (Tablica 3). Sukladno tome, većina sudionika bila je dobrog stanja uhranjenosti i bez izražene sarkopenije (mac ≤ 22 cm), a niti jedan ispitanik nije bio pothranjen. Tek manji broj (manje od jedne petine) bio je predkrhak ili krhak (Tablica 3). Manji broj ispitanika odnosio se na aktivne pušače.

Tablica 3. Osnovna obilježja ispitanika

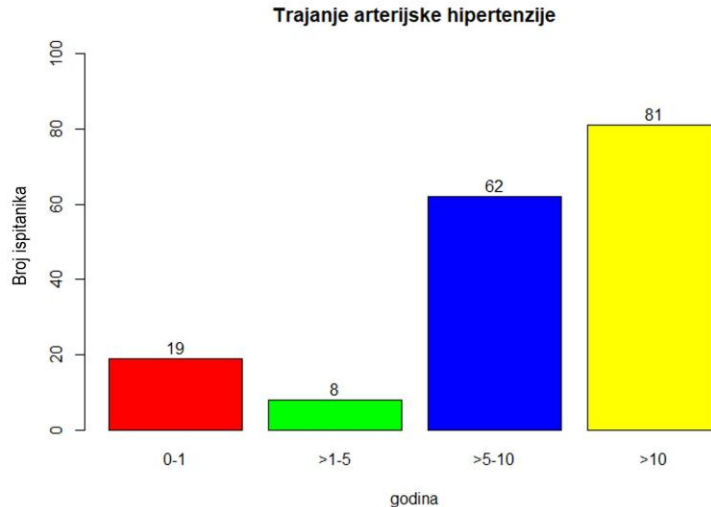
Karakteristike pacijenata	Medijan (interkvartilni raspon)	Aritmetička sredina (SD)	Broj (N)
Dob (godine)	66.00 (12.00)		50-65 - 79 66-75 - 63 >75 – 28
Spol (M, Ž)			M – 95 Ž – 75
Trajanje T2D (godine)	8.00 (10.00)		
Trajanje arterijske hipertenzije (godine)	10.00 (8.00)		
BMI (kg/m ²)			<25 - 20 25-30 - 67 >30 – 83
Obujam struka (cm)	103.00 (13.00)		
Obujam, srednjeg dijela nadlaktice (cm)	30.00 (4.00)		

Nutritivni status (ukupan rezultat MNA-SF testa)			Normalna uhranjenost - 144 rizik za pothranjenost – 26
Pušenje			Nikada - 68 Trenutno - 31 Bivši – 71
Rezultat Frailty testa (0-5)			0 – 97 1 – 25 2 – 18 3 – 16 4 – 7 5 – 7
Frailty rezultat (0 – robusan; 1 – predkrah; 2 –krhak)			0 – 97 1 – 42 2 – 31
Metabolički sindrom (M)			NE – 19 DA – 76
Metabolički sindrom (Ž)			NE – 6 DA – 69

BMI – indeks tjelesne mase; MNA-SF- eng. Mini Nutritional Assesment - Short Form



Slika 8. Trajanje dijabetesa tip 2: 0-1 godinu (N=15), >1-5 godina (N=59), >5-10 godina (N=38), >10 godina (N=58)



Slika 9. Trajanje arterijske hipertenzije: 0-1 godinu (N=19), >1-5 godina (N=8), >5-10 godina (N=62), >10 godina (N=81)

Iz Tablice 4., vidljivo je da je većina sudionika imala dobro kontroliranu glikemiju, što pokazuju vrijednosti HbA1C u rasponu od 5,2 % do 7,6 %, koje su unutar raspona preporučenih vrijednosti stručnih društava (s obzirom na dob i komorbiditetna stanja). Oko dvije trećine sudionika imalo je održanu bubrežnu funkciju. Većina slučajeva imala je blago sniženu bubrežnu funkciju (eGFR 90-60 ml/min) ili umjerenog stupnja (eGFR <60 ml/min).

Kada je riječ o komplikacijama T2D, otprilike jednoj trećini pacijenata dijagnosticirana je koronarna bolest. Postojao je visok udio onih kojima je dijagnosticirano kronično srčano popuštanje, iako je izostavljen podatak o vrijednosti ejakcijske frakcije lijeve klijetke, tako da nije bilo moguće razlučiti pojedince s očuvanom od onih sa smanjenom ejakcijskom frakcijom. U usporedbi s epidemiološkim podacima, postojao je visok udio pacijenata koji su imali razvijenu dijabetičku retinopatiju (>30%). Za nekardiovaskularne komorbiditete, opisni podaci ukazuju na visoku prevalenciju mišićno-koštanih bolesti i anksioznih poremećaja.

Analizom propisanih lijekova uočen je visok udio pacijenata kojima su propisani antihipertenzivi iz skupine ACE-INH/ARB i hipolipemici poznatiji kao „statini“, što pokazuje da se liječnici obiteljske medicine pridržavaju važećih smjernica u liječenju hipertenzije i dislipidemije. Ipak, i dalje je visok postotak pacijenata kojima je propisivan klasični metformin, kao lijek prve linije u

liječenju T2D, dok je nova skupina antidiijabetika s kardio-protektivnim i reno- protektivnim učinkom (GLPRA i SGLT2inh) propisivana u niskoj stopi.

Tablica 4. Klinička obilježja ispitanika

Kliničke karakteristike pacijenata			
Eritrociti (x 10 ¹² /L)		4.79 (0.44)	
Hematokrit (%)	42.30 (4.70)		
Glukoza (mmol/L)	7.95 (3.18)		
HbA1C (%)	6.90 (1.70)		
Kolesterol (mmol/L)	5.20 (1.70)		
LDL (mmol/L)		3.21 (1.04)	
HDL (mmol/L)	1.31 (0.40)		
Trigliceridi (mmol/L)	1.73 (0.90)		
eGFR (ml/min/1.73 m ²)	83.00 (34.75)		>90 – 54 60-90– 63 <60 – 53
TSH (mIU/L)	2.52 (1.70)		
Urati (μmol/L)	320.0 (80.00)		
Broj komorbiditeta			≤3 - 8 >3 - 162
Dijagnoze kroničnih bolesti			
Arterijska hipertenzija			NE - 18 DA - 152
Koronarna arterijska bolest (KAB) CAD (eng. Coronary Artery Dis.)			NE - 111 DA - 59
Kronične srčane bolesti (KSB) CHD (eng. Chronic Heart Dis.)			NE - 89 DA - 91
Jedna ili više od: KAB, KSB, KVB, PAB			NE - 83 DA - 87
Dijabetička retinopatija			NE - 122 DA - 48

Kronične respiratorne bolesti (KOPB ili astma)			NE - 156 DA - 14
Gastrintestinalne bolesti			NE - 98 DA - 72
Osteoporoza			NE - 132 DA - 78
Osteoartritis			NE - 84 DA - 86
Lumbosakralni sindrom			NE - 59 DA - 111
Bolesti štitnjače			NE - 137 DA - 33
Urogenitalne bolesti			NE - 120 DA - 50
Inkontinencija urina			NE - 144 DA - 26
Anksiozni poremećaj/ Depresija			NE - 67 DA - 103
Propisani lijekovi			
Ukupan broj propisanih lijekova			≤3 - 9 >3 - 161
metformin			NE - 46 DA - 124
derivati sulfonilureje			NE - 132 DA - 38
pioglitazon			NE - 160 DA - 10
metformin, derivati Sulfonilureje., pioglitazon – svi zajedno (starija skupina antidijabetika)			NE - 26 DA - 144
DPP4 Inhibitori (eng. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor)			NE - 140 DA - 30
GLP1RA (eng. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist)			NE - 155 DA - 15
SGLT2 inh (eng. Sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors)			NE - 164 DA - 6
DPP4 inh., GLP1RA, SGLT2 inh. – svi zajedno (novija skupina oralnih antidijabetika)			NE - 119 DA - 51
inzulinska terapija			NE - 130 DA - 40
ACE-inhibitori ili sartani (ARB)			NE - 37 DA - 133

blokatori kalcijjskih kanala			NE - 98 DA - 72
beta-blokatori			NE - 93 DA - 77
diuretici			NE - 57 DA - 113
statini			NE - 27 DA - 143
NSAID			NE - 49 DA - 121

HbA1C - hemoglobinA1C; LDL – lipoprotein male gustoće (eng. Low-density lipoprotein); HDL – lipoprotein visoke gustoće (eng. High-density lipoprotein); eGFR – procijenjena bubrežna funkcija (eng. Estimated Glomerular Filtration Rate) ; TSH – tireostimulirajući hormon; CVD – kardiovaskularne bolesti (eng. cardiovascular disease); CAD – koronarna arterijska bolest (eng. coronary artery disease); CHD -kronične srčane bolesti (eng. chronic heart disease); DPP4inh – (eng. dipeptidyl peptidase-4 inhibitor); GLP1RA –(eng. glucagon-like peptide-1 receptor agonists); SGLT2inh –(eng. sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors); ACE-INH – (eng. Angiotensin converting enzyme inhibitors); ARBs – (eng. Angiotensin receptor blockers); NSAID – nesteroidni protuupalni lijekovi (eng.Non-steroidal anti-inflammatory drugs)

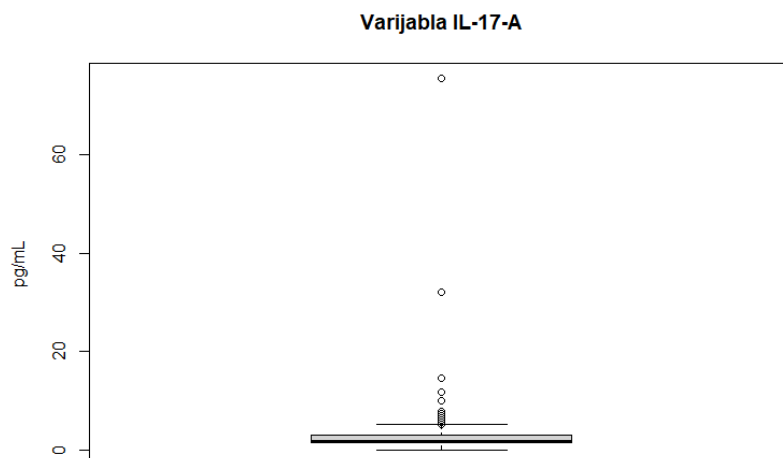
Kada je riječ o upalnim markerima, izuzev jedne ekstremne vrijednosti, u većine ispitanika usko je područje vrijednosti citokina IL-17A (IQR 0,21 – 3,21), što ukazuje na njegovu nisku varijabilnost (Tablica 5, Slika 10). Vrijednosti IL-37 su za većinu ispitanika oscilirale između 3,40 i 38,0 pg/mL, a bile su iskrivljene oko srednje vrijednosti od 13,40 pg/mL (Tablica 5). Drugi, konvencionalniji markeri upale, NLR i CRP, pokazali su istu karakteristiku – iskrivljenost oko srednjih vrijednosti (Tablica 5).

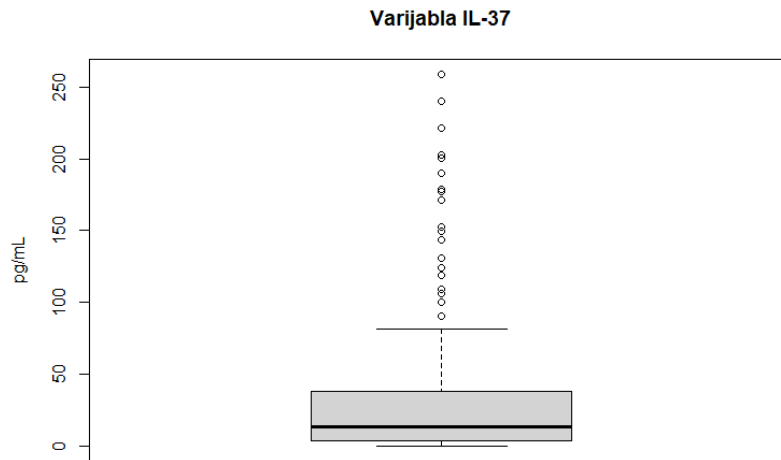
Kao što se vidi na slici 11, varijabilnost IL-37 bila je veća u gornjem dijelu raspona vrijednosti, dosežući do 258,80 pg/mL (bez jedne ekstremne vrijednosti), nego u donjem dijelu raspona vrijednosti, gdje je minimalna vrijednost bila je 0,14 pg/mL. Jedan pacijent pokazao je izuzetno visoku vrijednost IL-37, od 1788,4 pg/mL.

Tablica 5. Pokazatelji upale

Upalni markeri	Medijan (IQR)	Aritmetička sredina (SD)	Broj (N)
Ukupan broj leukocita ($\times 10^9/L$)		7.58 (1.77)	
Broj limfocita ($\times 10^3/mL$)	2.45 (1.17)		
Broj neutrofila ($\times 10^3/mL$)	3.99 (1.43)		
Limfociti %		34.26 (8.65)	
Neutrofili %		53.06 (8.37)	
NLR	1.60 (0.90)		
CRP (mg/L)	1.90 (2.20)		
Hemoglobin (g/L)	143.00 (18.00)		
IL-17A (pg/mL)	1.71 (1.50)		
IL-37 (pg/mL)*	13.40 (34.60)		

* Izbačena je jedna ekstremna vrijednost. NLR- omjer neutrofila i limfocita (eng. neutrophil-to-lymphocyte ratio); CRP- C-reaktivni protein; IL-17A- interleukin17A; IL-37-interleukin 37

**Slika 10. Raspodjela IL-17A među ispitanicima (box-plot dijagram)**



Slika 11. Raspodjela IL-37 među ispitanicima (box-plot dijagram)

5.2. Raspodjela vrijednosti citokina IL-17A i IL-37 prema kvartilama

5.2.1 Interleukin IL-17A

S obzirom na iskrivljenost raspodjele vrijednosti citokina IL-17A, vrijednosti u kvartilama nižeg ranga vrlo su male i blizu jedna drugoj, što pokazuju granične vrijednosti 1,42 (između prve i druge kvartile), 1,71 (između druge i treće kvartile), odnosno 2,92 (između treće i četvrte kvartile) (Tablica 6 i 7).

Kao što je vidljivo i u rezultatima analize razlika, varijable koje su pokazale značajne razlike među kvartilama IL-17A bile su one koje su ukazivale na glavne KV čimbenike rizika, uključujući LDL-kolesterol i HbA1C te hemoglobin (marker kronične upale koji je rezultat opterećenja većim brojem komorbiditeta) (Tablica 6). Iz tablice 6 može se vidjeti da vrijednosti ovih varijabli ne rastu linearno, dok vrijednost IL-17A raste s povećanjem ranga kvartila IL-17A, što može biti učinak višestrukih međusobno povezanih čimbenika na povećanje koncentracije IL-17A u serumu. Raspodjela vrijednosti citokina IL-37 prema kvartilnim vrijednostima citokina IL-17A prikazana je na slici 12, gdje se može vidjeti da vrijednosti IL-37 ne rastu linearno prema

vrijednostima kvartila IL-17A te da se porast IL-37 može očekivati tek u gornjoj kvartili IL-17A (Slika 12). Nije uočeno da su stupnjevi opadanja bubrežne funkcije povezani s varijacijama u IL-17A (Tablica 6), niti je utvrđeno da se razlike u učestalosti stadija eGFR razlikuju prema razinama kvartila IL-17A (Slika 13).

Tablica 6. Razlike u raspodjeli ispitivanih varijabli među kvartilama IL-17A. Numeričke varijable.

Varijable	1. kvartila 39 zapisa	2. kvartila 46 zapisa	3. kvartila 40 zapisa	4. kvartila 45 zapisa	p-vrijednost	Post hoc test (Parovi kvartila i prilagodena p- vrijednost)
Broj limfocita (x 109/L)	2.43 (1.21)	2.51 (1.12)	2.54 (0.79)*	2.58 (1.36)	0.81**	
Broj neutrofila (x 109/L)	53.70 (1.35)	3.96 (1.29)	3.92 (1.16)*	3.95 (1.45)	0.80**	
Limfociti %	34.99 (8.19)*	33.20 (9.49)*	34.27 (7.52)*	34.69 (9.23)*	0.79***	
Neutrofili %	52.99 (7.60)*	53.49 (8.04)*	52.77 (8.17)*	52.92 (9.69)*	0.98***	
NLR	1.60 (0.90)	1.77 (0.69)*	1.60 (0.63)	1.60 (1.05)	0.93**	
CRP (mg/L)	2.00 (1.70)	1.90 (1.40)	2.25 (2.90)	1.70 (4.10)	0.30**	
IL-37	0.26 (0.58)	7.20 (5.80)	19.60 (9.30)	80.40 (95.35)	<0.01**	
eGFR ml/min/1.73m2	75.90 (28.22)*	83.26 (24.12)*	79.67 (23.46)*	82.67 (28.60)*	0.56***	
Dob (godine)	68.21 (9.39)*	63.00 (10.75)	69.12 (6.94)*	66.47 (8.25)*	0.08**	
Obujam struka (cm)	103.00 (11.50)	104.00 (14.00)	102.50 (11.25)	104.50 (10.00)*	0.88**	
Srednji obujam nadlaktice (cm)	30.03 (3.13)*	29.76 (3.38)*	29.00 (2.25)	30.44 (2.97)*	0.22**	
Trajanje dijabetesa (godine)	9.00 (10.00)	9.00 (9.00)	6.50 (10.50)	8.00 (11.00)	0.96**	
Trajanje hipertenzije (godine)	10.97 (6.38)*	10.00 (9.50)	10.50 (7.00)	11.22 (4.75)*	0.66**	

Leukociti (x 10 ⁹ /L)	7.65 (1.63)*	7.24 (1.47)*	7.41 (1.74)*	8.00 (2.14)*	0.20***	
Eritrociti (x 10 ¹² /L)	4.80 (0.47)*	4.78 (0.47)*	4.89 (0.37)*	4.59 (0.44)*	0.20***	
LDL (mmol/L)	3.51 (0.82)*	3.05 (1.10)*	2.92 (1.07)*	3.39 (1.06)*	0.03***	2 - 1 – 0.18***** 3 - 1 – 0.05 4 - 1 – 0.95 3 - 2 – 0.93 4 - 2 – 0.40 4 - 3 – 0.15
HDL (mmol/L)	1.29 (0.330)	1.33 (0.40)	1.33 (0.30)*	1.37 (0.42)	0.45**	
Hemoglobin (g / dl)	146.00 (18.00)	143.40 (13.81)*	147.0 (14.75)	138.20 (10.96)*	0.02**	2 - 1 – 1.00***** 3 - 1 – 1.00 4 - 1 – 0.36 3 - 2 – 1.00 4 - 2 – 0.16 4 - 3 – 0.01
Hematokrit (%)	42.48 (4.09)*	42.40 (13.81)*	43.11 (2.88)*	41.24 (3.52)*	0.12***	
Glukoza na tašte (mmol/L)	7.00 (2.60)	8.45 (2.58)	8.95 (3.15)	7.70 (3.10)	0.06**	
HbA1C%	6.60 (1.20)	7.00 (1.73)	7.60 (1.90)	6.80 (1.20)	0.02**	2 - 1 – 0.12***** 3 - 1 – 0.05 4 - 1 – 1.00 3 - 2 – 1.00 4 - 2 – 0.43 4 - 3 – 0.20
Trigliceridi (mmol/L)	1.80 (0.80)	1.75 (1.16)	1.60 (0.79)	1.77 (0.92)	0.46**	
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5.47 (1.11)*	5.23 (1.44)*	5.08 (1.31)*	5.20 (1.20)	0.35**	
TSH (mIU/L)	2.40 (1.49)	2.42 (1.84)	3.10 (1.60)	2.39 (1.80)	0.30**	
Urati (µmol/L)	342.6 (59.75)*	315.00 (70.00)	314.90 (65.08)*	330.00 (66.00)	0.11**	

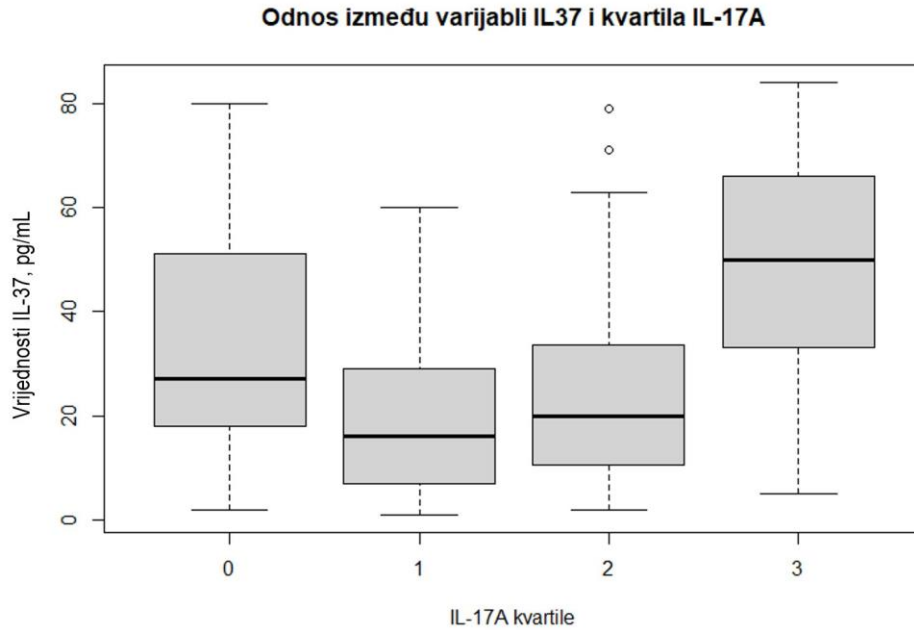
*Aritmetička sredina (SD) – normalna raspodjela (**Podobljane su značajne razlike.**)

**Kruskal-Wallis rank sum test (p-vrijednost manja od razine značajnosti 0,05, iz čega možemo zaključiti da postoje značajne razlike između skupina)

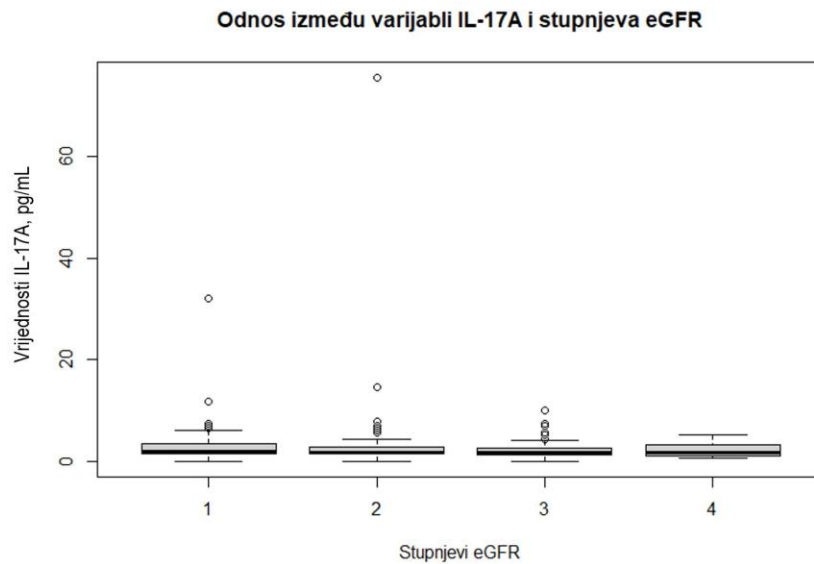
***ANOVA test (p-vrijednost manja od razine značajnosti 0,05, iz čega možemo zaključiti da postoje značajne razlike između skupina)

**** ANOVA post hoc test (Tukey's test) (značajne razlike s p- vrijednosti manjom od 0,05)

***** KW post hoc test (Dunnov test s Bonferronijevom korekcijom) (značajne razlike s p- vrijednosti manjom od 0,05).



Slika 12. Raspodjela vrijednosti citokina IL-37 prema kvartilnim vrijednostima citokina IL-17A



Slika 13. Raspodjela vrijednosti citokina IL-17A prema procijenjenoj brzini glomerularne filtracije (eng. *Estimated Glomerular Filtration Rate*): eGFR >90 ml/min/1.73m², 60-90 ml/min/1.73m², <60-40 ml/min/1.73m², <40 ml/min/1.73m²

Značajne razlike među kvartilama IL-17A također su pronađene za varijable koronarne arterijske bolesti i kronične srčane bolesti, ali njihova raspodjela slijedi nelinearni obrazac, što pokazuje činjenica da je sudionicima u nižoj i višoj kvartili IL-17A češće dijagnosticirana koronarna arterijska bolest ili kronična srčana bolest od onih u srednjim kvartilama (Tablica 7) (Slika 14). Isti obrazac raspodjele pokazao se i za dijagnoze anksioznih poremećaja (Tablica 7). Značajne varijacije u raspodjeli među kvartilama citokina IL-17A pokazala su i druga kronična stanja, uključujući križobolju, urogenitalne poremećaje, inkontinenciju urina i gastrointestinalne poremećaje (Tablica 7).

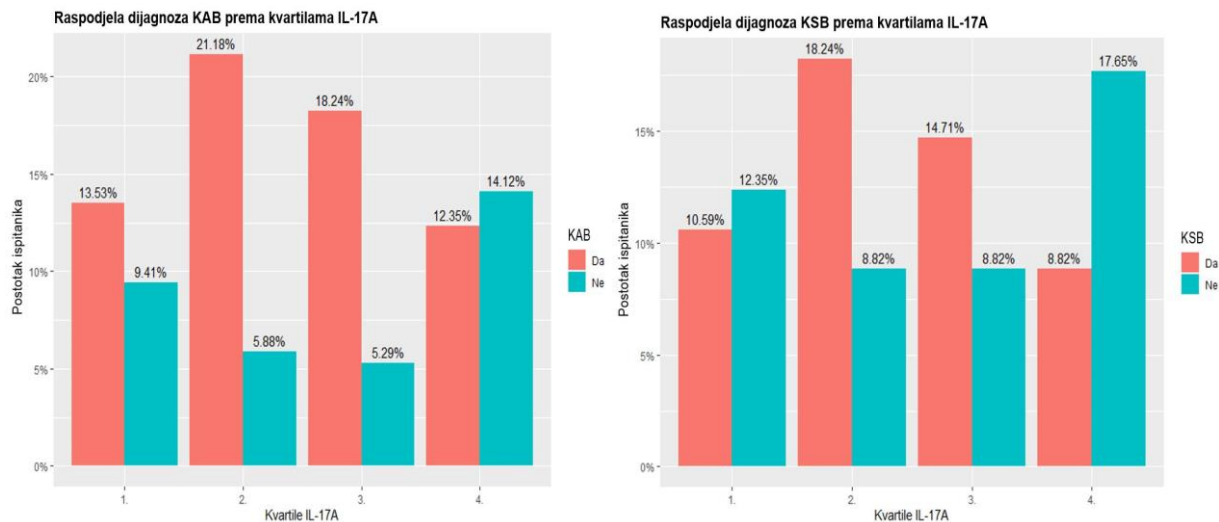
Table 7. Razlike među ispitivanim varijablama između kvartila IL-17A. Kategorijske varijable

Varijable	1. kvartila 39 zapisa	2. kvartila 46 zapisa	3. kvartila 40 zapisa	4. kvartila 45 zapisa	Ukupno 170 zapisa	p-vrijednost
eGFR ml/min/1.73m ²						
<60	15 (38.5%)	11 (23.9%)	14 (35.0%)	13 (28.8%)	53 (31.2%)	0.75
60-90	15 (38.5%)	19 (41.3%)	13 (32.50%)	16 (35.6%)	63 (37.0%)	
>90	9 (23.0%)	16 (34.8%)	13 (32.50%)	16 (35.6%)	54 (31.8%)	
Frailty indeks						
0	21 (53.9%)	28 (60.9%)	19 (47.50%)	29 (64.4%)	97 (57.1%)	0.42*
1	12 (30.8%)	11 (23.9%)	13 (32.5%)	6 (13.3%)	42 (24.7%)	
2	6 (15.3%)	7 (15.2%)	8 (20.0%)	10 (22.3%)	31 (18.2%)	
Frailty rezultat						
0	21 (53.9%)	28 (60.9%)	19 (47.5%)	29 (64.4%)	97 (57.1%)	0.43*
1	10 (25.6%)	6 (13.0%)	6 (15.0%)	3 (6.7%)	25 (14.7%)	
2	2 (5.1%)	5 (10.9%)	7 (17.5%)	4 (8.9%)	18 (10.6%)	
3	3 (7.7%)	3 (6.5%)	4 (10.0%)	6 (13.3%)	16 (9.4%)	
4	1 (2.6%)	1 (2.2%)	2 (5.0%)	3 (6.7%)	7 (4.1%)	
5	2 (5.1%)	3 (6.5%)	2 (5.0%)	0 (0.0%)	7 (4.1%)	
Spol = Muškarci	20 (51.3%)	19 (41.3%)	17 (42.5%)	19 (42.2%)	75 (44.1%)	0.78

Dob						
50-65	16 (41.0%)	26 (56.5%)	13 (32.5%)	24 (53.3%)	79 (46.5%)	0.22
66-75	16 (41.0%)	12 (26.1%)	21 (52.5%)	14 (31.1%)	63 (37.1%)	
>75	7 (41.0%)	8 (17.4%)	6 (15.0%)	7 (15.6%)	28 (16.5%)	
Pušenje						
Nikada	17 (43.6%)	19 (41.3%)	16 (40.0%)	16 (35.6%)	68 (40%)	0.66
Sadašnji + bivši	22 (56.4%)	27 (58.7%)	24 (60.0%)	29 (64.4%)	102 (60%)	
BMI 25 kg/m ²						
<25	3 (7.7%)	8 (17.4%)	5 (12.5%)	4 (8.9%)	20 (11.8%)	0.70*
25-30	17 (43.6%)	19 (41.3%)	16 (40.0%)	15 (33.3%)	67 (39.4%)	
>30	19 (48.7%)	19 (41.3%)	19 (47.5%)	26 (57.8%)	73 (42.9%)	
Nutritivni status						
Normalno stanje uhanjenosti	34 (87.2%)	36 (78.3%)	35 (87.5%)	39 (86.7%)	144 (84.7%)	0.56
NSAID = DA	30 (76.9%)	34 (73.9%)	24 (60.0%)	33 (73.3%)	121 (71.2%)	0.34
KOPB ili astma = DA	6 (15.4%)	1 (2.2%)	4 (10.0%)	3 (6.7%)	14 (8.2%)	0.15*
CVD i/ili cerebrovaskularne bolesti = DA	2 (5.1%)	9 (19.6%)	9 (22.5%)	12 (26.7%)	32 (18.8%)	0.65
KAB = DA	16 (41.0%)	10 (21.7%)	9 (22.5%)	24 (53.3%)	59 (34.7%)	<0.01
KSB = DA	21 (53.8%)	15 (32.6%)	15 (37.5%)	30 (66.7%)	81 (47.6%)	<0.01
Gastrointestinalne bolesti = DA	21 (53.8%)	10 (21.7%)	14 (35.0%)	28 (62.2%)	73 (42.9%)	<0.01
Osteoporoza = DA	7 (17.9%)	8 (17.4%)	7 (17.5%)	16 (35.6%)	38 (22.4%)	0.10
Osteoartritis = DA	25 (64.1%)	22 (47.8%)	16 (40.0%)	23 (51.1%)	86 (50.6%)	0.19
Križobolja = DA	30 (76.9%)	33 (71.7%)	18 (45.0%)	30 (66.7%)	111 (65.3%)	0.01
Bolesti štitnjače = DA	4 (10.3%)	10 (21.7%)	10 (25.0%)	9 (20.0%)	33 (19.4%)	0.38
Inkontinencija urina = DA	7 (17.9%)	4 (8.7%)	3 (7.5%)	12 (26.7%)	26 (15.3%)	0.04
Urogenitalne bolesti = DA	17 (43.6%)	7 (15.2%)	8 (45.0%)	18 (40.0%)	50 (29.4%)	<0.01
Anksiozni poremećaj = DA	26 (66.7%)	22 (47.8%)	19 (47.5%)	35 (77.8%)	102 (60.0%)	<0.01

Dijabetička retinopatija = DA	14 (35.9%)	14 (30.4%)	8 (20.0%)	12 (26.7%)	48 (28.2%)	0.45
metformin = DA	28 (71.8%)	33 (71.7%)	28 (70.0%)	35 (77.8%)	124 (72.9%)	0.86
derivati sulfonilureje= DA	8 (20.50%)	7 (15.2%)	11 (27.5%)	12 (26.7%)	38 (22.4%)	0.47
pioglitazon = DA	4 (10.3%)	4 (8.7%)	1 (2.5%)	1 (2.2%)	10 (5.9%)	0.32*
metformin, derivati sulfonilureje, pioglitazon – svi zajedno (starija skupina antidijabetika) = DA	33 (84.6%)	36 (78.3%)	35 (87.5%)	40 (88.9%)	144 (84.7%)	0.51
DPP4 inh = Yes	7 (17.9%)	12 (26.1%)	8 (20.0%)	3 (6.7%)	30 (17.6%)	0.10
SGLT2 inh = DA	3 (7.7%)	2 (4.3%)	1 (2.5%)	0 (0.0%)	6 (3.5%)	0.24*
GLP1RA = da	2 (5.1%)	6 (13.0%)	3 (7.5%)	4 (8.9%)	15 (8.8%)	0.68*
DPP4 inh., GLP1RA, SGLT2 inh. – svi zajedno (novija skupina oralnih antidijabetika = DA	12 (30.8%)	20 (43.5%)	12 (30.0%)	7 (15.6%)	51 (30.0%)	0.04
inzulin = DA	7 (17.9%)	15 (32.6%)	8 (20.0%)	10 (22.2%)	40 (23.5%)	0.38
ACE-INH ili ARBs= DA	31 (79.5%)	32 (69.6%)	32 (80.0%)	38 (84.4%)	133 (72.2%)	0.37
blokatori kalcijevih kanala = DA	16 (41.0%)	17 (37.0%)	14 (35.0%)	25 (55.6%)	82 (48.2%)	0.20
diuretici = DA	25 (64.1%)	25 (54.3%)	31 (77.5%)	31 (68.9%)	112 (65.9%)	0.15
beta- blokatori = DA	18 (46.2%)	15 (32.6%)	15 (37.5%)	28 (62.2%)	76 (44.7%)	0.03
Hiperlipidemija (terapija statinima) = DA	33 (84.6%)	37 (80.4%)	31 (77.5%)	42 (93.3%)	133 (78.2%)	0.20
Broj komorbiditeta ≤3	35 (89.7%)	44 (95.7%)	39 (97.5%)	44 (97.8%)	162 (95.3%)	0.40*
Broj propisanih lijekova ≤3	35 (89.7%)	43 (93.5%)	39 (97.5%)	44 (97.8%)	161 (94.7%)	0.38*
Metabolički sindrom (Muškarci)	15 (38.5%)	13 (28.3%)	15 (37.5%)	13 (28.9%)	56 (32.9%)	0.48*
Metabolički sindrom (Žene)	19 (48.7%)	26 (56.5%)	21 (52.5%)	26 (57.8%)	92 (54.1%)	0.38*

eGFR – procijenjena bubrežna funkcija (eng. Estimated Glomerular Filtration Rate); BMI- indeks tjelesne mase (eng. body mass index; NSAID- nesteroidni protuupalni lijekovi (eng. non-steroidal anti-inflammatory drugs); CVD- kardiovaskularne bolesti (eng. cardiovascular disease; KAB- koronarna arterijska bolest (eng. coronary artery disease; KSB- kronične srčane bolesti (eng. chronic heart disease; DPP4 inh.- (eng. dipeptidyl peptidase-4 inhibitor); SGLT2- (eng. sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors); GLP1RA-(eng. glucagon-like peptide-1 receptor agonists); ACE-INH- (eng. Angiotensin converting enzyme inhibitors); ARBSs- (eng. Angiotensin receptor blockers
 Pearsonov chi-kvadrat test*Fisher test; Zadebljano- značajne razlike



Slika 14. Raspodjela dijagnoza koronarne arterijske bolesti i kronične srčane bolesti među kvartilama IL-17A

U regresijskim modelima (Tablica 8), varijable koje su pokazale značajne varijacije među kvartilama IL-17A bile su one koje ukazuju na upalu, poremećaj lipida i druga zdravstvena stanja, uključujući osteoporozu, osteoartritis i urogenitalne bolesti. Iz tablice 8, vidljivo je da prilikom procjene povezanosti čimbenika pokazatelja upale s razinama IL-17A treba uzeti u obzir spol i dob. Također, prilikom procjene povezanosti komorbiditetnih stanja u obzir treba uzeti i status krhkosti (Tablica 8). Kada je riječ o antidijabeticima, DPP4 inh i Pioglitazon bili su značajno, ali neovisno povezani s IL-17A (Tablica 8). Kada je riječ o KV bolestima, iz Tablice 7 i 8 vidljivo je da KAB i KSB iako pokazuju značajne razlike u učestalosti među kvartilama IL-17A, nisu neovisno povezane s varijacijama u razinama IL-17A. Jedino zdravstveno stanje koje neovisno može pridonijeti višim razinama IL-17A je osteoporozu (Tablica 8). Nije uočeno da su stupnjevi opadanja bubrežne funkcije povezani s varijacijama u IL-17A, niti je utvrđeno da se razlike u učestalosti stadija eGFR razlikuju prema razinama kvartila IL-17A (Tablice 6 i 8, Slika 14).

Tablica 8. Multinomialni logistički regresijski modeli za kvartile IL-17A. Svi modeli su prilagođeni za dob, spol, trajanje T2D i indeks slabosti.

A) Model “Upalni markeri“, uključne varijable: broj eritrocita, broj leukocita, hemoglobin, hematokrit, IL-37, % neutrofila i %limfocita (ili broj neutrofila i limfocita); Akaike IC: 475.23

	Kvartila 2		Kvartila 3		Kvartila 4	
	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)
Dob	-2.07	0.94 (0.88-0.99)				
Spol = Ž	2.99	6.87 (2.38-19.86)	2.34	4.46 (1.56-12.78)		
Hemoglobin	2.27	1.14 (1.03-1.26)	2.49	1.16 (1.05-1.29)		
Limfociti %	-3.19	0.84 (0.77-0.92)	-2.35	0.87 (0.79-0.96)	-2.27	0.88 (0.80-0.97)
Neutrofilii %	-2.10	0.90 (0.82-0.98)	-2.02	0.89 (0.82-0.98)	-2.34	0.88 (0.80-0.96)
IL-37	-2.84	0.96 (0.94-0.98)				

B) Model “Antropometrijske mjere“, ulazne varijable: BMI, obujam struka, srednji obujam nadlaktice; AIC: 497,61 – Nijedna od ulaznih varijabli nije pokazala značajne korelacije s izlaznim varijablama (kvartile IL-17A).

C) Model “Laboratorijske pretrage“, ulazne varijable: eGFR, glukoza natašte, HbA1c, trigliceridi, ukupni kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, TSH i urati ; AIC: 506,23

	Kvartila 2		Kvartila 3		Kvartila 4	
	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)
Trigliceridi	-2.78	0.34 (0.18-0.64)				

LDL	-3.36	0.04 (0.01-0.20)	-2.10	0.17 (0.04-0.68)
Ukupni kolesterol	3.01	12.80 (3.18-51.52)		

D) Model “Kardio-metabolički komorbiditeti”, ulazne varijable: hipertenzija = ne, <10 godina trajanja, >10 godina trajanja, KAB, KSB, Retinopatija, MS (M, Ž), pušenje; AIC: 501.06 - Nijedna od ulaznih varijabli nije pokazala značajne korelacije s izlaznim varijablama (kvartile IL-17A).

E) Model “Ostali komorbiditeti”, ulazne varijable : osteoporoza, osteoartritis, križbolja, anksioznost/depresija, KOPB/astma, gastrointestinalni poremećaji, poremećaji štitnjače, urogenitalne bolesti; AIC: 513,93.

	Kvartila 2		Kvartila 3		Kvartila 4	
	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)
Osteoporoza = 1					2.36	10.10 (2.01-50.66)
Osteoartritis = 1	-2.17	0.21 (0.06-0.69)				
Urogenitalne bolesti = 1	-2.18	0.19 (0.06-0.66)				
Frailty index = 1					-2.25	0.16 (0.04-0.61)
Frailty index =2					-2.26	0.07 (0.01-0.48)

F) Model “Razina komorbiditeta i funkcionalni poremećaji”, ulazne varijable: indeks slabosti (0, 1, 2), stanje uhranjenosti (razine), inkontinencija urina, broj komorbiditeta i broj propisanih lijekova; AIC: 494,51.

	Kvartila 2		Kvartila 3		Kvartila 4	
	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)

Frailty index = 1	-1.92	0.30 (0.11-0.84)
-------------------	-------	---------------------

G) Model “Antidijabetici”, ulazne varijable: metformin, derivati sulfonilureje, pioglitazon, DPP4inh, GLP1RA, SGLT2inh, inzulinska terapija; AIC: 541,47.

	Kvartila 2		Kvartila 3		Kvartila 4	
	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)
pioglitazon = 1					-1.98	0.06 (0.01-0.62)
DPP4 inh = 1					-2.41	0.08 (0.02-0.46)
Frailty index = 1					-2.00	0.23 (0.07-0.77)

H) Model “Drugi propisani lijekovi”, ulazne varijable: NSAID, ACE-INH/ARB, blokatori kalcijevih kanala, beta-blokatori, diuretici, statini; AIC: 498,77 - Nijedna od ulaznih varijabli nije pokazala značajne korelacije s izlaznim varijablama (kvartile IL-17A).

*Svi modeli su prilagođeni za dob, spol, trajanje T2D i indeks krhkosti

5.2.2 Interleukin IL-37

Granične vrijednosti IL-37 između 1. i 2. kvartile iznosile su 3,40, između 2. i 3. kvartile 13,40, a između 3. i 4. kvartile 38,00 pg/mL (Tablice 9 i 10). Kada smo procijenili koje varijable pokazuju varijacije između kvartila IL-37, rezultati su ukazali da je riječ o laboratorijskim testovima, i to broju eritrocita, hemoglobina i hematokrita, koji se mogu smatrati markerima kronične upale, ali i nutritivne. Varijacije su pokazale i varijable HbA1c (granični značaj) i LDL-kolesterol, koji ukazuju na metaboličke poremećaje. LDL-kolesterol je pokazao značajne razlike,

ali na niskim razinama vrijednosti IL-37, između prve i druge kvartile, pri čemu je važno spomenuti da su vrijednosti LDL-kolesterola modificirane liječenjem, gotovo svi pacijenti su primali hipolipemike tipa statina (Tablica 3).

Kada su uzete u obzir trendovi preko kvartila, hemoglobin, hematokrit i HbA1c su pokazale tendenciju pada kako je rastao rang kvartila (Tablica 9). Razine opadanja bubrežne funkcije nisu pokazale povezanost s rastom ranga kvartila IL-37 (Tablica 9) (Slika 15).

Table 9. Razlike u raspodjeli ispitivanih varijabli između kvartila IL-37. Numeričke varijable.

Varijable	1. kvartila 41 zapis	2. kvartila 41 zapis	3. kvartila 44 zapisa	4. kvartila 44 zapisa	p-vrijednost	Post hoc test	p-vrijednost
Broj limfocita(x 103/mL)	2.64 (0.90)*	2.56 (0.79)	3.30 (5.39)*	2.62 (1.06)*	0.88**		
Broj neutrofila (x 103/mL)	4.00 (0.74)	4.10 (1.32)	5.07 (6.70)*	4.23 (1.59)*	0.98**		
Limfociti %	33.80 (9.90)	34.20 (11.50)	33.20 (9.53)	32.90 (13.98)	0.74**		
Neutrofili %	52.80 (10.60)	53.20 (10.80)	53.50 (8.90)	54.50 (15.88)	0.79**		
NLR	1.59 (0.84)	1.51 (0.80)	1.83 (0.89)*	1.80 (0.79)*	0.73**		
CRP (mg/L)	2.18 (1.92)*	2.39 (1.93)*	3.14 (2.82)*	3.61 (3.65)*	0.38***		
IL-17A (pg/mL)	1.58 (0.54)	1.63 (0.61)	1.82 (1.23)	3.56 (3.77)	0.02		
eGFRml/min/1.73m ²	84.00 (43.00)	83.00 (43.00)	84.50 (35.00)	76.61 (25.09)*	0.39**		
Dob (godine)	67.46 (9.62)*	64.95 (7.84)*	69.07 (8.83)*	67.07 (8.14)*	0.18***		
Obujam struka (cm)	106.00 (8.00)	100.00 (15.00)	103.34 (10.84)*	103.80 (12.10)*	0.44**		
Srednji obujam nadlaktice (cm)	29.00 (3.00)	29.00 (4.00)	30.34 (2.88)*	30.30 (3.14)*	0.12**		
Trajanje T2D (godine)	10.00 (12.00)	10.00 (11.00)	5.00 (9.75)	9.00 (7.25)	0.64**		
Trajanje art. hipertenzije (godine)	12.00 (7.00)	10.00 (6.00)	10.00 (8.00)	11.34 (5.20)*	0.28**		
Ukupni leukociti (x 109/L)	7.58 (1.45)*	7.53 (1.55)*	7.38 (1.72)*	7.82 (2.26)*	0.77**		
Eritrociti(x 10 ¹² /L)	4.48 (0.37)*	4.89 (0.43)*	4.81 (0.46)*	4.62 (0.46)*	0.02***	1-0 2-0 3-0	0.96**** 0.99 0.08

						2-1	0.86
						3-1	0.02*
						3-2	0.15
LDL	2.84 (1.08)*	3.45 (1.04)*	3.38 (1.04)*	3.18 (0.94)*	0.04***	1-0	0.99
						2-0	0.62
						3-0	0.780.04****
						2-1	0.07
						3-1	0.43
						3-2	
HDL	1.29 (0.35)	1.40 (0.50)	1.40 (0.49)	1.30 (0.30)	0.09**		
Hemoglobin	143.80 (10.68)*	148.00 (16.00)	140.20 (14.65)*	139.60 (12.86)*	0.03**	1-0	1.00*****
						2-0	1.00
						3-0	0.65
						2-1	0.16
						3-1	0.03*
						3-2	1.00
Hematokrit	42.64 (2.97)*	43.20 (3.90)	41.72 (4.17)*	41.49 (3.52)*	0.04**	1-0	1.00*****
						2-0	1.00
						3-0	0.60
						2-1	0.25
						3-1	0.04*
						3-2	1.00
Glukoza na tašte	2.90 (3.60)	8.10 (3.00)	7.35 (2.05)	7.65 (2.83)	0.10**		
HbA1C	7.68 (1.28)*	6.90 (1.90)	6.80 (1.33)	6.70 (1.53)	0.06**		
Trigliceridi	1.60 (1.17)	1.77 (0.61)	1.83 (1.47)	1.77 (1.03)	0.32**		
Kolesterol	4.95 (1.38)*	5.57 (1.32)*	5.57 (1.42)*	5.00 (0.98)	0.15**		
TSH	2.80 (1.90)	2.35 (1.86)	3.03 (2.01)	2.41 (1.38)	0.29**		
Urati	315.00 (54.71)*	326.80 (62.84)*	322.50 (82.50)	330.0 (88.25)	0.40**		

Medijan (IQR)

*Aritmetička sredina (SD) – normalna distribucija

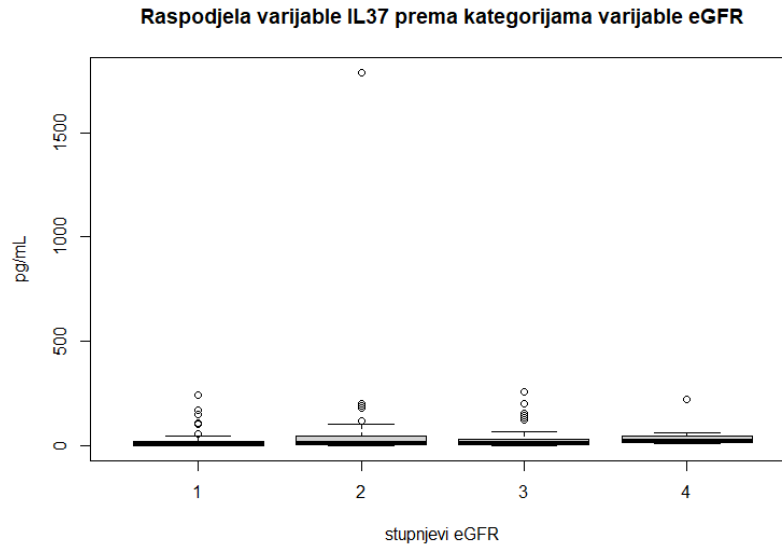
**Kruskal-Wallis rank sum test (p vrijednosti su manje od razine 0,05, iz čega se može zaključiti da postoji značajna razlika između skupina)

***ANOVA test (p vrijednosti su manje od razine 0,05, iz čega se može zaključiti da postoji značajna razlika između skupina)

**** ANOVA post hoc test (Tukey's test) (značajne razlike s p-vrijednosti manjom od 0.05)

***** KW post hoc test (Dunn's test with a Bonferroni correction) (značajne razlike s p- vrijednosti manjom od 0,05)

Podobljano – značajne razlike



Slika 15. Raspodjela IL-37 prema stupnjevima opadanja bubrežne funkcije, definirane kao:
eGFR >90, 60-90, <60-40, <40 ml/min

Kada je riječ o komorbiditetnim stanjima, samo su KAB i gastrointestinalne bolesti pokazale značajnost (Tablica 10). Kada se uzmu u obzir lijekovi, tada se skupina nove generacije oralnih antidijetika uključujući DPP4, SGLT2 i GLP1, uzeti kao skupina, pokazala značajnim (Tablica 10). Kada se promatraju razlike između parova kvartila, tada je udio dijabetičara s KVB, uključujući KAB i KSB, pokazao tendenciju povećanja paralelno s višim vrijednostima IL-37 (Tablica 10) (Slika 16).

Istodobno, udio bolesnika kojima su propisivani oralni antidijetici novije generacije, pokazuje tendenciju pada sukladno porastu vrijednosti IL-37 (Tablica 10) (Slika 17).

Tablica 10. Razlike u raspodjeli ispitivanih varijabli između kvartila IL-37. Kategorijske varijable

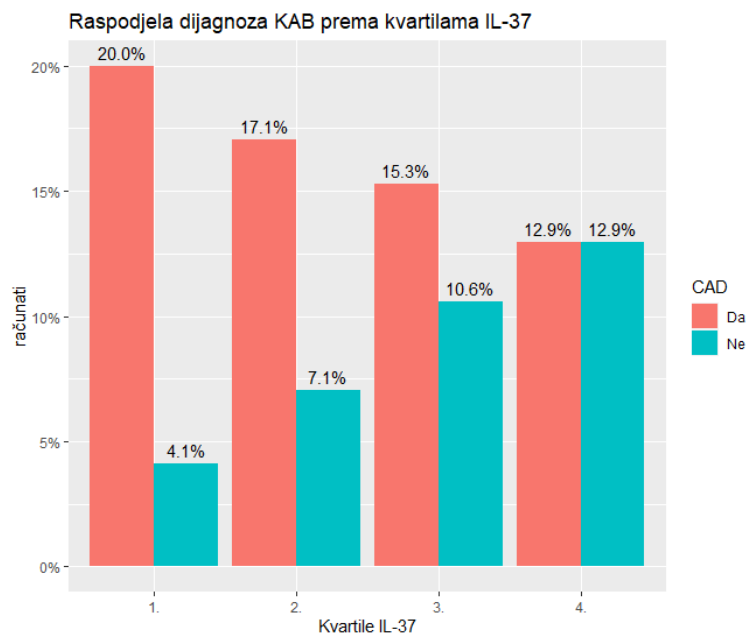
Varijable	1. kvartila 41 zapis	2. kvartila 41 zapis	3. kvartila 44 zapisa	4. kvartila 44 zapisa	Ukupno 170 zapisa	p- vrijednost
eGFR ml/min/1.73m ²						0.78

<60	11 (26.8%) 14 (34.1%)	13 (31.7%)	16 (39.0%)	13 (29.5%)	53 (31.2%) 63 (37.0%)	
60-90	16 (39.0%)	15 (36.6%)	14 (34.1%)	20 (45.5%)	54 (31.8%)	
>90)		13 (31.7%)	14 (34.1%)	11 (25.0%)		
Frailty index						
0	17 (41.5%)		22 (50.0%)	30 (68.2%)		
1	15 (36.6%)	28 (68.3%)	11 (25.0%)	8 (18.2%)	97 (57.1%)	0.11
2	9 (22.0%)	8 (19.5%) 5 (12.2%)	11 (25.0%) 11 (25.0%)	6 (13.6%)	42 (24.7%) 31 (18.2%)	
Frailty rezultat						
0	17 (41.5%)	28 (68.3%)	22 (50.0%)	30 (68.2%)	97 (57.1%)	
1	8 (19.5%)	4 (9.8%)	8 (18.2%)	5 (11.4%)	25 (14.7%)	
2	5 (17.0%)	4 (9.8%)	4 (9.1%)	3 (6.8%)	18 (10.6%)	0.32*
3	5 (12.2%)	3 (7.2%)	3 (6.8%)	5 (11.4%)	16 (9.4%)	
4	2 (4.9%)	0 (0.0%)	4 (9.1%)	1 (2.4%)	6 (4.1%)	
5	2 (4.9%)	2 (4.9%)	3 (6.8%)	0 (0.0%)	7 (4.1%)	
Spol = M	21	20	15	19	74	0.39
Dob						
50-65	16	23	19	21	82	0.46
66-75	18	14	14	17	63	
>75	7	4	11	6	28	
Pušenje						
Nikada	16	14	22	16	68	0.19
Trenutno + Bivši	25	27	22	28	102	
BMI kg/m2						
<25	6	6	5	3	20	0.69*
25-30	16	16	13	22	67	
>30	19	19	26	19	83	
Nutritivni status						
Normalno stanje uhranjenosti	32	35	39	38	144	0.57
NSAID = DA	30	28	29	34	121	0.65
Kronična opstruktivna bolest pluća ili astma = DA	6	2	3	3	14	0.15*
CVD ili cerebrovaskularne bolesti = DA	11	9	12	10	42	0.92

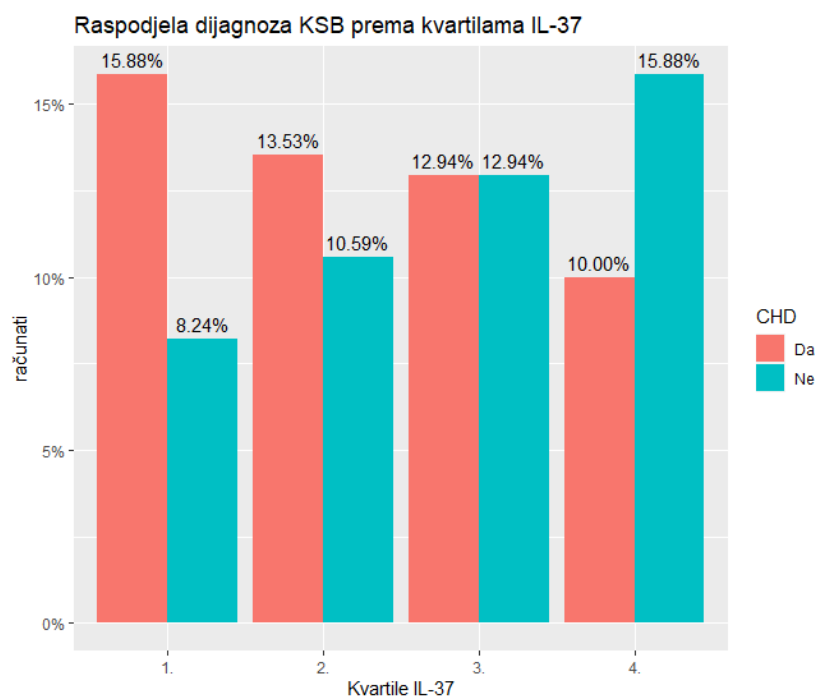
KAB = DA	7	12	18	22	59	< 0.01
KSB= DA	14	1	22	27	64	0.08
Gastrointestinalne bolesti. = DA	8	19	22	23	72	< 0.01
Osteoporozna= DA	5	9	11	13	38	0.27
Osteoartritis = DA	17	22	21	26	86	0.40
Križobolja = DA	28	25	28	30	121	0.87
Bolesti štitnjače = DA	9	9	7	8	33	0.87
Inkontinencija urina = DA	3	4	11	8	26	0.09
Urogenitalne bolesti = DA	10	12	13	15	50	0.81
Anksiozni poremećaj= DA	18	27	30	27	102	0.10
Dijabetička retinopatija= DA	12	13	14	9	48	0.60
metformin = DA	32	27	31	34	124	0.54
derivati sulfonilureja = DA	9	8	9	12	38	0.83
pioglitazon = DA	1	3	3	3	10	0.32*
metformin, derivati sulfonilureje, pioglitazon – svi zajedno (starija skupina antidijabetika) = DA	34	33	37	40	144	0.58
DPP4 inh= DA	12	8	6	4	30	0.09
SGLT2 inh = DA	3	1	2	0	6	0.24*
GLP1RA = DA	6	4	3	2	15	0.68*
DPP4 inh., GLP1RA, SGLT2 inh. – svi zajedno (novija skupina oralnih antidijabetika = DA	21	13	11	6	51	< 0.01
inzulin = DA	10	11	11	8	40	0.80
ACE-INH ili ARB-ovi = DA	32	30	37	34	133	0.68

blokatori kalcijevih kanala = DA	14	18	20	20	72	0.68
diuretici = DA	26	26	31	29	112	0.89
beta-blokatori = DA	14	18	23	21	76	0.39
Hiperlipidemija (terapija statinima) = DA	35	33	36	39	141	0.73
Broj komorbiditeta = ≤3 >3	38	38	44	42	162	0.40*
Broj propisanih lijekova ≤3 >3	39	38	42	42	161	0.38*
Metabolički sindrom (Muškarci)	15	13	15	13	56	0.66*
Metabolički sindrom (Žene)	19	26	21	26	92	0.32*

eGFR – procijenjena bubrežna funkcija (eng. Estimated Glomerular Filtration Rate); BMI- indeks tjelesne mase (eng. body mass index); NSAID- nesteroidni protuupalni lijekovi (eng. non-steroidal anti-inflammatory drugs); CVD- kardiovaskularne bolesti (eng. cardiovascular disease); KAB- koronarna arterijska bolest (CAD, eng. coronary artery disease); KSB- kronično srčane bolesti (CHD eng. chronic heart disease); DPP4 inh.- (eng. dipeptidyl peptidase-4 inhibitor); SGLT2- (eng. sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors); GLP1RA-(eng. glucagon-like peptide-1 receptor agonists); ACE-INH- (eng. Angiotensin converting enzyme inhibitors); ARBSs- (eng. Angiotensin receptor blockers)
Pearsonov chi-kvadrat test*Fisher test; Zadebljano- značajne razlike

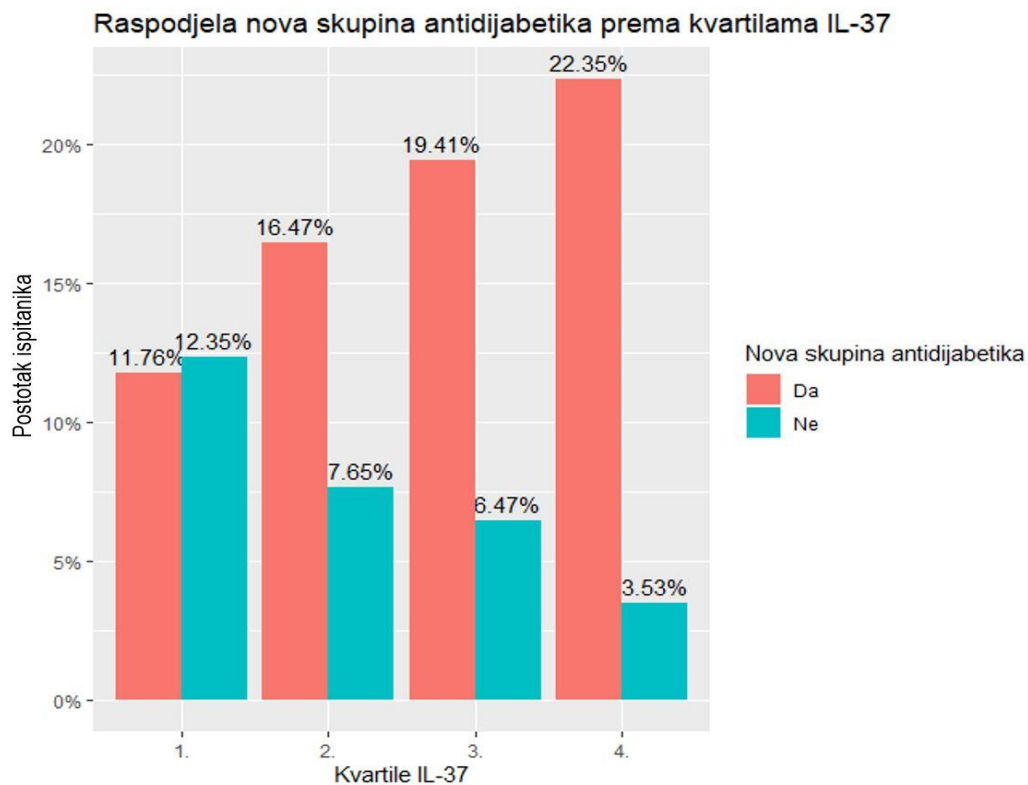


a)



b)

Slika 16. Raspodjela dijagnoza koronarne arterijske bolesti (a) i kronične srčane bolesti (b) između kvartila IL-37.



Slika 17. Raspodjela dijabetičara kojima je propisana nova skupina antidijabetika prema kvartilama IL-37

Kao što je vidljivo u regresijskim modelima, brojni su čimbenici koji ukazuju na kliničke karakteristike dijabetičara koje su povezane s višim kvartilama IL-37, ukazujući i na pozitivnu i na negativnu povezanost (Tablica 11). U svim modelima, indeks krhkosti modulira povezanost drugih varijabli s IL-37 i negativno utječe na razinu IL-37.

Tablica 11. Multinomialni logistički regresijski modeli za kvartile IL-37. Svi modeli su prilagođeni za dob, spol, trajanje T2D i indeks krhkosti

A) Model “Markeri upale”, ulazne varijable u ulazu: IL-17A, broj leukocita, broj eritrocita, hemoglobin, hematokrit, % neutrofili, % limfociti (ili broj neutrofila i broj limfocita) i CRP. AIC: 486,24.

	Kvartila 2		Kvartila 3		Kvartila 4	
	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)
		0.26				0.22
Frailty index = 1	-2.33	(0.10-0.70)			-2.43	(0.08-0.61)
Frailty index = 2	-1.92	(0.05-0.79)			-1.82	(0.06-0.86)
Eritrociti					-3.36	0.01 (0.001-0.10)
CRP					2.32	1.36 (1.10-1.70)
IL-17A					2.35	1.43 (1.11-1.84)

B) Model “ Antropometrijske mjere”, ulazne varijable: BMI, obujam struka, srednji obujam nadlaktice. AIC: 489.14

	Kvartila 2		Kvartila 3		Kvartila 4	
	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)
Frailty index = 1	-2.16	0.30 (0.12-0.75)			-2.17	0.29 (0.11-0.74)
Obujam struka			-2.70	0.92 (0.87-0.97)	-1.96	0.94 (0.90-0.99)
Srednji obujam nadlaktice			2.77	1.44 (1.16-1.79)	2.19	1.33 (1.07-1.64)

C) Model “Laboratorijski testovi“, ulazne varijable: eGFR, glukoza na tašte, HbA1c, trigliceridi, ukupni kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, TSH i urati. AIC: 506.91

	Kvartila 2		Kvartila 3		Kvartila 4	
	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)
Frailty index = 1	-1.98	0.31 (0.12-0.82)			-1.97	0.31 (0.12-0.82)
TSH					-1.97	0.74 (0.58-0.95)

D) Model “Kardio- metabolički komorbiditeti”, ulazne varijable: hipertenzija =NE, <10 trajanje u godinama, >10 trajanje u godinama, KAB, KSB, periferna arterijska bolest, cerebrovaskularne bolesti, retinopatija, MS (M, F), pušenje; AIC: 418.00

	Kvartila 2		Kvartila 3		Kvartila 4	
	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)
Frailty index = 1	-2.25	0.25 (0.09-0.69)			-1.99	0.30 (0.11-0.81)
Frailty index = 2	-2.17	0.13 (0.03-0.61)				
KAB = 1			2.13	4.47 (1.40-14.25)		

KAB- koronarna arterijska bolest (CAD, eng. coronary artery disease)

E) Model “Ostali komorbiditeti”, ulazne varijable: dijagnoza osteoartritisa, dijagnoza osteoporoze, križbolje, anksioznost, KOPB/astma, gastrointestinalne bolesti, bolesti štitnjače, urogenitalne bolesti; AIC: 496.12

	Kvartila 2		Kvartila 3		Kvartila 4	
	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)
Frailty index = 1	-2.69	0.19 (0.07-0.53)			-2.95	0.16 (0.06-0.45)
Križbolja= 1	-2.51	0.18 (0.06-0.56)	-2.35	0.21 (0.07-0.62)	-2.00	0.27 (0.09-0.79)
Gastro-intestinalne bolesti = 1	2.37	4.59 (1.60-13.20)	2.36	4.25 (1.55-11.66)	2.52	4.90 (1.74-13.80)

F) Model “Razina komorbiditeta i funkcionalni poremećaji”, ulazne varijable: indeks slabosti (0,1,2), stanje uhranjenosti (razine), inkontinencija urina, broj komorbiditeta i broj propisanih lijekova; AIC: 494,51.

	Kvartila 2		Kvartila 3		Kvartila 4	
	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)	z-vrijednost	OR (95% CI)
Frailty index = 1	-2.65	0.21 (0.08-0.55)			-2.63	0.22 (0.08-0.57)
Frailty index = 2	-2.21	0.11 (0.02-0.57)				
Inkontinencija urina = 1					2.01	5.35 (1.36-21.12)

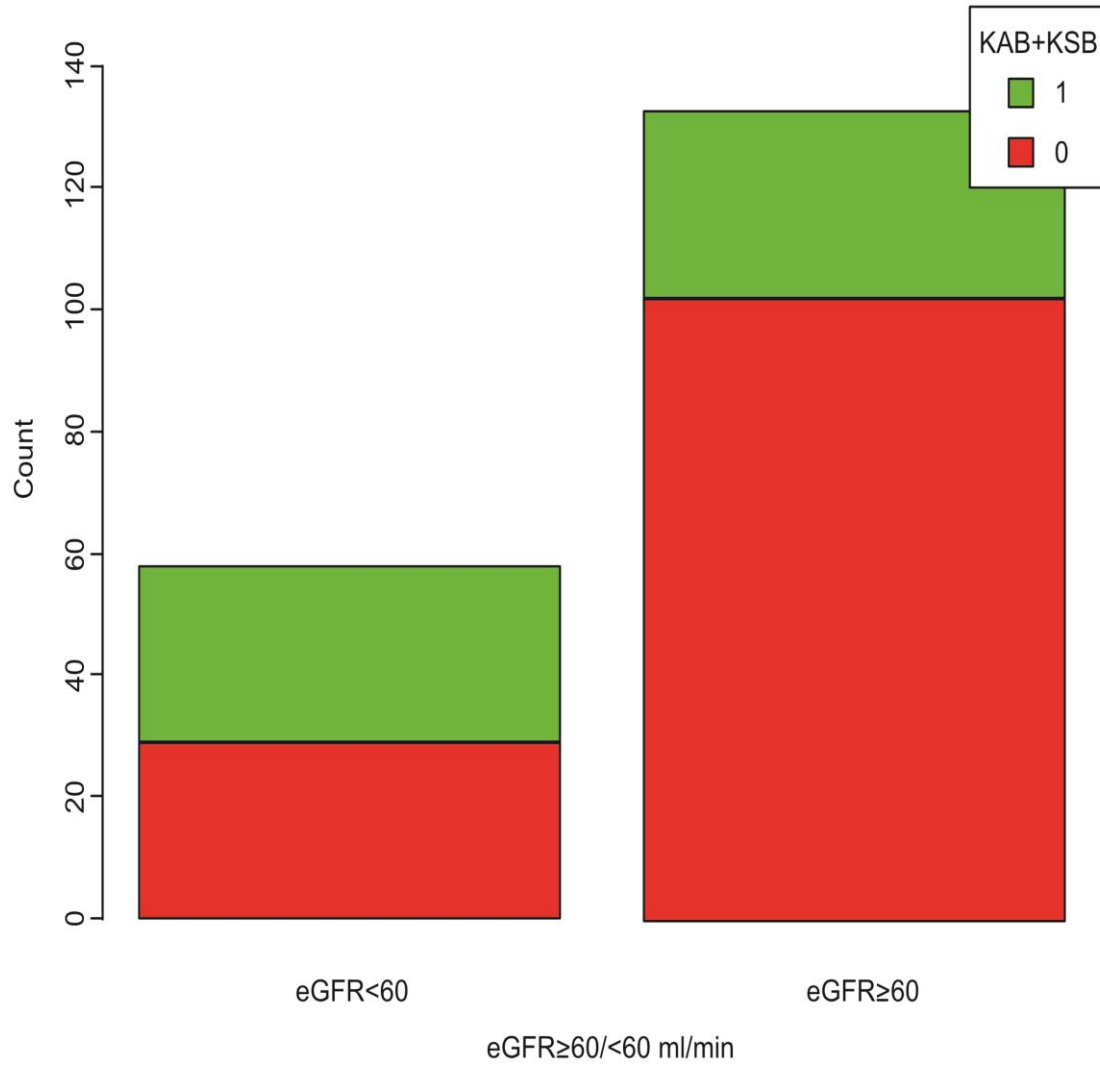
G) Model “ Antidijabetici”, ulazne varijable: metformin, derivati sulfonilureje, pioglitazon, DPP4 inh, GLP1RA, SGLT2-inh, inzulin; AIC: 425.36

	Quartile 2		Quartile 3		Quartile 4	
	z-value	OR (95% CI)	z-value	OR (95% CI)	z-value	OR (95% CI)
Frailty index = 1	-2.25	0.26 (0.10-0.70)			-2.04	0.29 (0.11-0.79)
metformin = 1	-2.20	0.21 (0.06-0.67)				
DPP4 = 1					-2.63	0.16 (0.05-0.50)

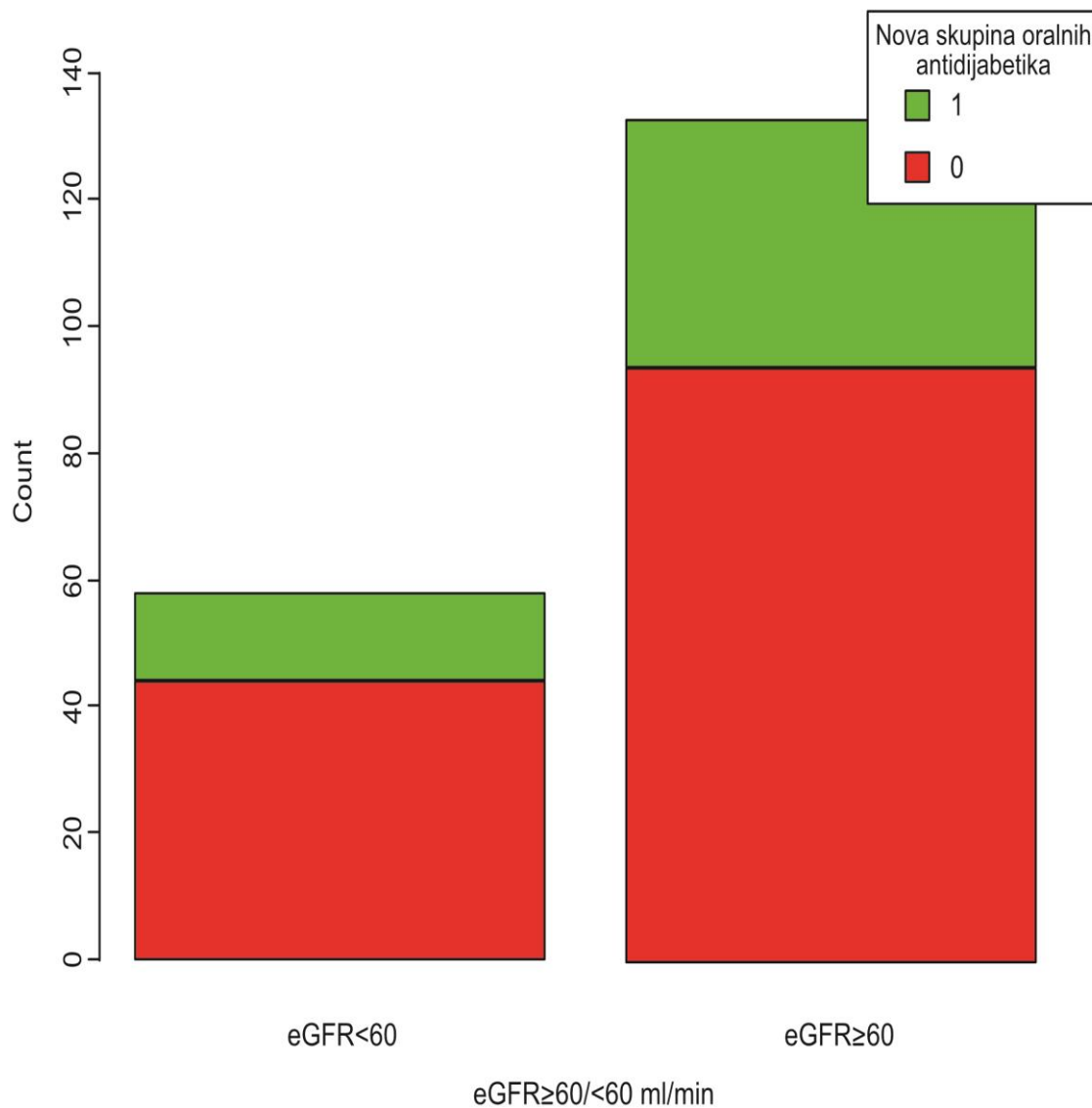
H) Model „ostali lijekovi“, ulazne varijable: NSAIL, ACE-INH or ARB, blokatori kalcijevih kanala, diuretici, B-blokatori, statini. AIC: 511.91

Ni jedna varijabla nije pokazala značajnu povezanost s izlaznom varijablom.

Suprotno očekivanju, kardiovaskularne bolesti, uključujući KAB i KSB, kao i BMI, nisu pokazali značajnu razliku prema stupnjevima bubrežnog popuštanja eGFR, ali se povećava udio ispitanika kojima je propisana „ novija skupina oralnih antidijabetika“ (Slike 18 i 19).

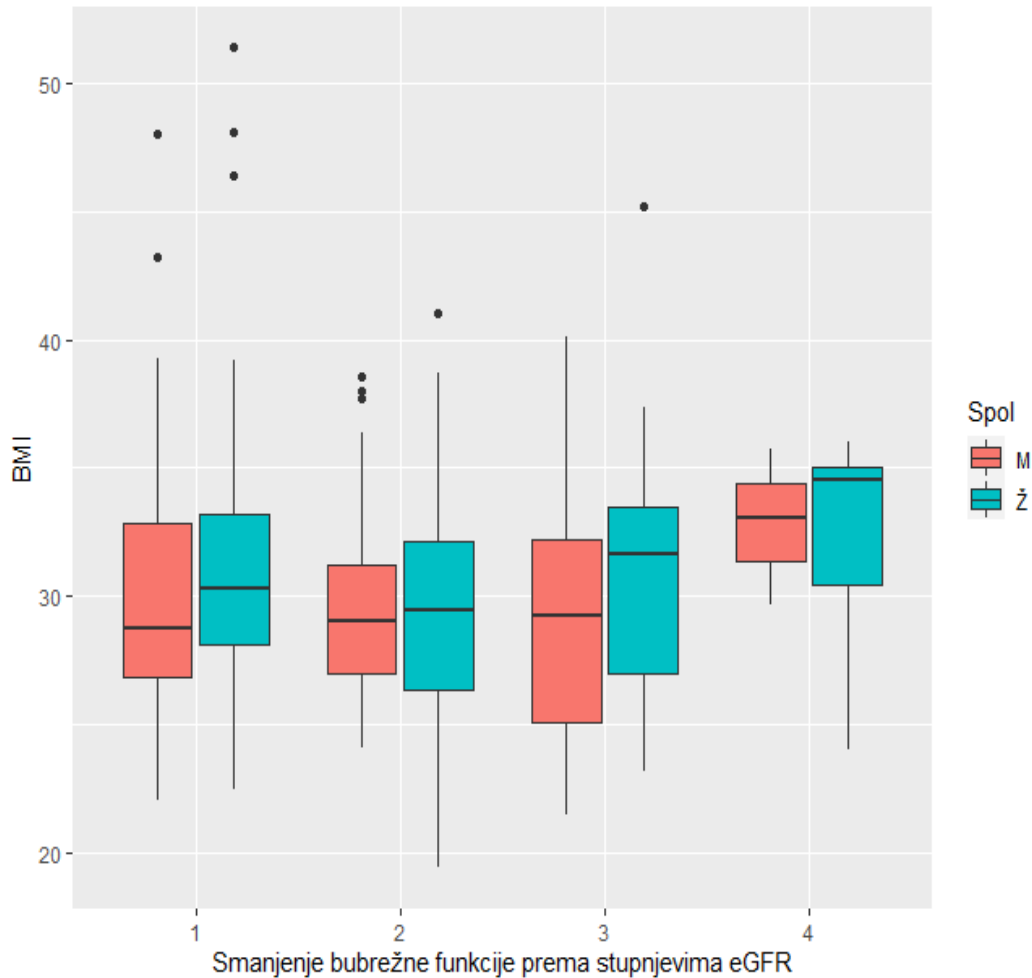


a)



b)

Slika 18. Raspodjela pacijenata (a) s koronarnom art. bolesti (KAB) i kroničnim srčanim bolestima (KSB) prema razinama smanjene bubrežne funkcije ($eGFR \geq 60 / < 60$ ml/min) (b) kojima je propisana nova skupina oralnih antidiijabetika prema stupnjevima smanjene bubrežne funkcije ($eGFR \geq 60 / < 60$ ml/min).



Slika 19. Prosječni BMI (M:Ž) prema stupnjevima smanjene bubrežne funkcije (1,2,3,4), okvirni prikaz.

5.3. Granične vrijednosti citokina IL-17A i IL-37 za pojedine podskupine bolesnika s T2D

5.3.1. Interleukin IL-17A

Utvrđene su granične vrijednosti IL-17A za nekoliko podskupina pacijenata (Tablica 12). Kao što pokazuju mjere osjetljivosti i specifičnosti te NPV (eng. *Negative Predictive Value*) i PPV (eng. *positive predictive value*), citokin IL-17A se može potencijalno koristiti za otkrivanje nekih podskupina starijih bolesnika s T2D, poput onih sa smanjenom bubrežnom funkcijom (eGFR<45 mL/min), sa pre- krhkosti i razvijenom krhkosti (frailty indeks), metabolički dobro reguliranim T2D (HbA1c <7%), te onih s dugotrajnim T2D trajanjem (>10 godina). Sa sigurnošću se može

reći da osobe s dijagnozama KAB ili KSB imaju vrijednosti citokina IL-17A iznad granične vrijednosti od 3,38 pg/L (Tablica 12).

Svaki od mjerenih upalnih markera ima dobre samo neke od mjera točnosti, a niti jedan, korišten zasebno, nije dobar marker za utvrđivanje podskupine ispitanika ili predviđanje ishoda. Uzevši u obzir klasične upalne markere, najveću korist pokazuju NLR i hemoglobin u isključenju (NPV) dijabetičara s niskom funkcijom bubrega (eGFR<45 mL/min) te hemoglobin i IL-17A u prepoznavanju (PPV) tih bolesnika (Tablica 12).

Tablica 12. Optimalne granične vrijednosti IL-17A i drugih upalnih markera za razlikovanje podskupina bolesnika s dijagnosticiranim T2D

Podskupine pacijenata	NLR	CRP (mg/L)	Hb (g/L)	IL-17A (pg/mL)
eGFR (mL/min/1.73 m ²) <60/≥60	Cutoff value: 2.4	5.2	130	1.61
	Osjetljivost: 0.32	0.23	0.89*	0.66
	Specifičnost: 0.90	0.87	0.28	0.47
	NPV: 0.75	0.72	0.54	0.75
	PPV: 0.59	0.44	0.73	0.36
eGFR (mL/min/1.73 m ²) <45/≥45	1.5	2.1	134	1.36
	0.86	0.86	0.79	0.81
	0.45	0.57	0.64	0.36
	0.97	0.98	0.21	0.15
	0.12	0.15	0.96	0.93
Frailty index 1 ili 2 / 0	3.09	1.2	135	3.4
	0.09	0.81	0.83	0.28
	0.97	0.37	0.41	0.85
	0.44	0.57	0.64	0.47
	0.82	0.63	0.65	0.71

HbA1c % <7/≥7 (granične vrijednosti ukazuju dobru kontrolu glikemije prema međunarodnim smjernicama)	1.59	2.5	140	1.25
	0.61	0.51	0.65	0.91
	0.54	0.70	0.48	0.24
	0.56	0.61	0.61	0.75
	0.59	0.60	0.49	0.52
BMI (kg/m2) < 25 /≥25	1.5	1.2	150	1.79
	0.7	0.79	0.4	0.49
	0.44	0.7	0.72	0.65
	0.92	0.30	0.90	0.14
	0.14	0.95	0.16	0.91
BMI(kg/m2) >30/≤30	1.2	0.9	148	1.62
	0.80	0.93	0.42	0.59
	0.28	0.22	0.64	0.48
	0.56	0.76	0.51	0.55
	0.54	0.53	0.55	0.52
Dg Kronično srčano popuštanje/ NE	1.59	1.8	142	3.38
	0.65	0.54	0.68	0.35
	0.57	0.51	0.59	0.87
	0.65	0.5	0.62	0.6
	0.58	0.55	0.65	0.7
Dg Koronarna arterijska bolest/NE	1.89	1.3	142	3.37
	0.42	0.73	0.62	0.39
	0.72	0.37	0.59	0.84
	0.7	0.72	0.45	0.72
	0.45	0.38	0.74	0.56
Dg CVD (jedna od, kronično srčano popuštanje, koronarna arterijska bolest arterija, periferna arterijska, cerebrovaskularna bolest)	1.24	6.2	142	2.88
	0.79	0.14	0.68	0.33
	0.33	0.95	0.55	0.82
	0.53	0.60	0.70	0.47
	0.62	0.67	0.52	0.72

Dg. Inkontinencija urina ili urogenitalne bolesti / NE	1.29 0.82 0.37 0.78 0.43	2.3 0.48 0.66 0.42 0.71	129 0.9 0.18 0.5 0.66	2.48 0.42 0.74 0.69 0.48
Dg. Anksiozni poremećaj /NE	1.9 0.41 0.81 0.47 0.76	4.8 0.24 0.9 0.44 0.78	137 0.79 0.43 0.76 0.48	2.88 0.35 0.85 0.46 0.78
Dg. Dijabetička retinopatija /NE	1.51 0.65 0.48 0.78 0.33	2.1 0.49 0.6 0.32 0.76	134 0.81 0.4 0.45 0.78	2.02 0.42 0.71 0.32 0.79
Trajanje T2D >10 godina /≤10 godina	1.3 0.74 0.33 0.71 0.36	1.4 0.69 0.45 0.43 0.71	134 0.82 0.38 0.52 0.72	1.26 0.88 0.2 0.77 0.36
Broj komorbiditeta >3/≤3	1.74 0.39 0.88 0.06 0.98	2.2 0.75 0.56 0.98 0.08	144 1 0.53 1 0.13	1.58 0.64 0.75 0.09 0.98
Metabolički sindrom (Muškarci)	Cut off vrijednosti: 1.3 Osjetljivost: 0.84 Specifičnost: 0.40 NPV: 0.72 PPV: 0.46	1.4 0.77 0.43 0.63 0.59	153 0.28 0.82 0.51 0.61	1.59 0.67 0.48 0.61 0.53

Metabolički sindrom (Muškarci)	<p>TSH</p> <p>Cut off vrijednosti: 2.17</p> <p>Osjetljivost: 0.77</p> <p>Specifičnost: 0.42</p> <p>NPV: 0.38</p> <p>PPV: 0.80</p>			
Metabolički sindrom (Žene)	<p>1.3</p> <p>0.83</p> <p>0.35</p> <p>0.78</p> <p>0.43</p>	<p>1.3</p> <p>0.83</p> <p>0.35</p> <p>0.78</p> <p>0.43</p>	<p>145</p> <p>0.52</p> <p>0.61</p> <p>0.43</p> <p>0.69</p>	<p>1.58</p> <p>0.71</p> <p>0.43</p> <p>0.72</p> <p>0.42</p>
Metabolički sindrom (Žene)	<p>TSH</p> <p>Cut off vrijednost: 2.35</p> <p>Osjetljivost : 0.61</p> <p>Specifičnost: 1.00</p> <p>NPV: 0.08</p> <p>PPV: 1.00</p>			

*vrijednosti > 80% smatraju se relevantnim i podebljane su.

eGFR- procijeniti brzinu glomerularne filtracije; BMI—indeks tjelesne mase, HbA1c-hemoglobinA1C

Ukoliko se procijeni diskriminirajuća moć IL-17A za stanja koja su povezana s DT2 ili specifičnim podskupinama pacijenata, može se zaključiti da ovaj upalni marker, bilo da se koristi samostalno, ili u kombinaciji s klasičnim upalnim markerima, ima nisku do umjerenu sposobnost predviđanja (AUC < 80%) (Tablica 13). Isto vrijedi i za ostale ispitivane markere upale.

Ukupno gledajući, upalni markeri su rijetko dosegli AUC prag od 80% (ili vrijednosti koje su mu blizu, poput 0,78 ili 0,79%), što se smatra dijagnostički relevantnim (Tablica 13) (Slika 20).

Kada se promatra sposobnost razlikovanja, za CRP je utvrđeno da u kombinaciji s drugim upalnim markerima, uključujući i IL-17A može poslužiti u razlikovanju starijih dijabetičara normalne tjelesne težine (BMI < 25 kg/m²) od onih koji imaju prekomjernu tjelesnu

težinu/pretilih, za Hb u razlikovanju dijabetičara prema razini komorbiditeta, a za NLR+Hb u razlikovanju žena s metaboličkim sindromom (Tablica 13).

Kao što je vidljivo na Slici 13, diskriminirajuće linije upalnih markera za žene s metaboličkim sindromom vrlo su nepravilne (u "cik-cak" oblicima), što ukazuje na visoku razinu heterogenosti (postojanje više podskupina) među ženama s metaboličkim sindromom.

Tablica 13. Područje ispod ROC za IL-17A i klasične upalne markere: NLR, CRP i hemoglobin, te kombinacije markera. Omjer neutrofila i limfocita (NLR) se koristio kao osnova za usporedbu.

Podgrupe pacijenata	Upalni markeri i njihove kombinacije	AUC (NLR basic)	p-vrijednost prema NLR
eGFR (mL/min/1.73 m ²) <45/≥45	IL-17A	0.56	0.43
	NLR	0.67	
	Hb	0.72	0.68
	CRP	0.74	0.40
	CRP + Hb	0.75	0.52
	NLR + CRP	0.76	0.21
	NLR + Hb	0.78	0.29
	NLR + CRP + Hb	0.79	0.23
eGFR (mL/min/1.73 m ²) <60/≥60	Hb+IL-17A	0.44	0.03
	CRP	0.49	0.11
	IL-17A	0.50	0.17
	Hb	0.55	0.51
	CRP + Hb	0.55	0.51
	NLR	0.60	
	NLR + Hb	0.63	0.24

Frailty index 1 or 2 / 0	CRP	0.54	0.45
	NLR + Hb	0.54	0.41
	IL-17A	0.55	0.45
	Hb	0.59	0.93
	NLR	0.60	
	CRP + Hb	0.61	0.76
	NLR + CRP + Hb	0.63	0.46
HbA1c % <7/≥7	IL-17A	0.53	0.59
	Hb	0.56	0.92
	NLR	0.56	
	CRP+IL-17A	0.57	0.90
	NLR+IL-17A	0.57	0.86
	CRP	0.58	0.84
	CRP+Hb	0.60	0.61
	Hb+NLR	0.60	0.60
BMI (kg/m2 <30/≥30	NLR	0.51	
	Hb	0.53	0.81
	NLR+Hb	0.53	0.38
	NLR+CRP	0.56	0.24
	CRP+Hb	0.58	0.25
	CRP	0.58	0.23
BMI (kg/m2 <25/≥25	Hb	0.49	0.69
	IL-17A	0.49	0.57
	NLR+IL-17A	0.52	0.81
	NLR	0.53	
	NLR+CRP	0.78	0.01
	CRP+Hb	0.76	0.01
	NLR+CRP+Hb	0.77	0.01
	CRP	0.78	0.02
	CRP+IL-17A	0.78	0.02
Dg. Kronične bolesti srca /NE	CRP	0.50	0.07

	IL-17A	0.56	0.34
	Hb	0.61	0.90
	Hb + IL-17A	0.61	0.92
	NLR	0.62	
	NLR + IL-17A	0.63	0.24
	NLR + Hb	0.65	0.35
	NLR + Hb + IL-17A	0.66	0.30
Dg. Koronarna art. bolest /NE	CRP	0.52	0.32
	IL-17A	0.56	0.67
	NLR	0.58	
	Hb	0.60	0.85
	CRP + Hb	0.60	0.83
	Hb + IL-17A	0.61	0.65
	NLR + Hb	0.63	0.28
Dg. Dijabetička retinopatija/ NE	CRP	0.53	0.35
	IL-17A	0.55	0.52
	NLR + IL-17A	0.57	0.60
	NLR + Hb	0.60	1.00
	Hb	0.60	0.86
	NLR	0.60	
Broj komorbiditeta >3 / ≤3	IL-17A	0.52	0.32
	NLR	0.58	
	CRP	0.60	0.85
	CRP + IL-17A	0.61	0.65
	NLR + CRP	0.66	0.22
	Hb	0.80	<0.01
Metabolički sindrom (Muškarci) / NE	Hb	0.53	0.69
	IL-17A + TSH	0.54	0.53
	TSH	0.51	0.51
	CRP + TSH	0.55	0.59
	IL-17A	0.56	0.68
	Hb + IL-17A	0.56	0.70

	CRP + Hb	0.57	0.90
	CRP	0.57	0.89
	NLR	0.58	
	NLR + TSH	0.58	0.97
	NLR + Hb	0.59	0.74
Metabolički sindrom (Žene) / NE	IL-17A	0.54	0.44
	NLR	0.67	
	CRP	0.67	0.99
	CRP+Hb	0.70	0.95
	Hb+IL-17A	0.73	0.86
	TSH+CRP	0.75	0.72
	TSH+IL-17A	0.78	0.59
	NLR+Hb	0.78	0.65
	TSH+NLR	0.85	0.14

Podobljano: AUC referentnog markera upale (NLR) i AUC oko 80% (smatra se dijagnostički važnim). eGFR- procijenjena bubrežna funkcija (eng. Estimated Glomerular Filtration Rate); HbA1c- hemoglobinA1C; BMI - indeks tjelesne mase

5.3.2 Interleukin IL-37

Procjena potencijalne kliničke korisnosti određivanja graničnih vrijednosti IL-37 u utvrđivanju podskupina pacijenata s T2D, kao što su oni s KAB, KSB ili drugim komplikacijama, nije se pokazala obećavajućom (Tablica 14). Svega u nekoliko slučajeva čini se da se vrijednost IL-37 može koristiti s dovoljnom preciznošću u predviđanju određenih komplikacija ili podskupina pacijenata.

Te su situacije uključivale pesimistično (negativno) predviđanje (isključivanje) snižene bubrežne funkcije (eGFR<45 ml/min) i prisutnosti KAB, ali i optimistično (pozitivno) predviđanje prisutnosti dijabetičke retinopatije kao i više komorbiditetnih stanja (više od 3). Posebno se ističe rezultat kada je razina IL-37 viša od 38,2 pg/mL, jer u tom slučaju s visokom razinom točnosti ukazuje na starije dijabetičare koji nisu pretili BMI<25 kg /m²). Najbolju diskriminirajuću vrijednost pokazao je TSH za osobe, posebno žene, s metaboličkim sindromom (Tablica 14).

Tablica 14. Optimalne granične vrijednosti IL-37 i drugih markera upale za razlikovanje podskupina bolesnika s dijagnosticiranim T2D u pogledu mjera: osjetljivosti, specifičnosti, negativne prediktivne vrijednosti i pozitivne prediktivne vrijednosti (ROC-analiza).

Podskupine	NLR	CRP (mg/L)	Hb (g/L)	IL-37* (pg/mL)
eGFR (mL/min/1.73 m2) <60/≥60	Cutoff vrijednosti : 2.4	5.2	130	7.2
	Osjetljivost: 0.32	0.23	0.89	0.74
	Specifičnost: 0.90	0.87	0.28	0.40
	NPV: 0.75	0.72	0.54	0.77
	PPV: 0.59	0.44	0.73	0.35
eGFR (mL/min/1.73 m2) <45/≥45	Cutoff vrijednosti 1.5	2.1	134	13.2
	Osjetljivost: 0.86	0.86	0.79	0.79
	Specifičnost: 0.45	0.57	0.64	0.47
	NPV: 0.97	0.98	0.21	0.96
	PPV: 0.12	0.15	0.96	0.12
Frailty index 1 or 2 / 0	3.09	1.2	135	3.4
	0.09	0.81	0.83	0.84
	0.97	0.37	0.41	0.34
	0.44	0.57	0.64	0.61
	0.82	0.63	0.65	0.63
Usporenost (poteškoće u hodaњу) DA/ NE	1.59	1.4	137	6
	0.63	0.68	0.71	0.72
	0.49	0.47	0.5	0.5
	0.82	0.30	0.33	0.34
	0.26	0.82	0.83	0.17
HbA1C % ≤6.8/>6.8 (srednja vrijednost)	2.01	2.5	141	7.2
	0.29	0.49	0.61	0.73
	0.75	0.70	0.51	0.43
	0.49	0.55	0.68	0.64
	0.57	0.65	0.58	0.54

HbA1C % <7/≥7 (granične vrijednosti ukazuju na dobru kontrolu glikemije prema međunarodnim smjericama)	1.59	2.5	140	7.2
	0.61	0.51	0.65	0.73
	0.54	0.70	0.48	0.46
	0.56	0.61	0.61	0.61
	0.59	0.60	0.49	0.60
BMI (kg/m2) < 25 / ≥25	1.5	1.2	150	38.2
	0.7	0.79	0.4	0.26
	0.44	0.7	0.72	0.95
	0.92	0.30	0.90	0.15
	0.14	0.95	0.16	0.95
BMI (kg/m2) >30/≤30	1.2	0.9	148	0.8
	0.80	0.93	0.42	0.88
	0.28	0.22	0.64	0.17
	0.56	0.76	0.51	0.6
	0.54	0.53	0.55	0.5
Dg. Kronične bolesti srca/ NE	1.59	1.8	142	14.6
	0.65	0.54	0.68	0.58
	0.57	0.51	0.59	0.58
	0.65	0.5	0.62	0.6
	0.58	0.55	0.65	0.55
Dg. koronarna art. bolest/ NE	Cutoff vrijednost: 1.89	1.3	142	10.2
	Osjetljivost: 0.42	0.73	0.62	0.78
	Specifičnost: 0.72	0.37	0.59	0.49
	NPV: 0.7	0.72	0.45	0.81
	PPV: 0.45	0.38	0.74	0.45
Dg. KVB (bilo koja od navedenih: kronične bolesti srca, koronarna arterijska bolest, periferna arterijska bolest, cerebrovaskularna bolest)	1.24	6.2	142	9.4
	0.79	0.14	0.68	0.67
	0.33	0.95	0.55	0.47
	0.53	0.60	0.70	0.51
	0.62	0.67	0.52	0.63

Dg. Inkontinencija urina ili urogenitalne bolesti /NE	1.29	2.3	129	10.2
	0.82	0.48	0.9	0.69
	0.37	0.66	0.18	0.45
	0.78	0.42	0.5	0.72
	0.43	0.71	0.66	0.42
Dg. Anksiozni poremećaj /NE	1.9	4.8	137	5.2
	0.41	0.24	0.79	0.77
	0.81	0.9	0.43	0.43
	0.47	0.44	0.76	0.55
	0.76	0.78	0.48	0.67
Dg. Dijabetička retinopatija/NE	1.51	2.1	134	28.8
	0.65	0.49	0.81	0.36
	0.48	0.6	0.4	0.77
	0.78	0.32	0.45	0.31
	0.33	0.76	0.78	0.8
Trajanje dijabetesa >10 godina /≤10 godina	1.3	1.4	134	15.6
	0.74	0.69	0.82	0.58
	0.33	0.45	0.38	0.62
	0.71	0.43	0.52	0.42
	0.36	0.71	0.72	0.74
Broj komorbiditeta >3/≤3	1.74	2.2	144	4.2
	0.39	0.75	1	0.74
	0.88	0.56	0.53	0.63
	0.06	0.98	1	0.1
	0.98	0.08	0.13	0.98
Metabolički sindrom (Muškarci)	Cutoff vrijednosti: 1.3	1.4	153	4.4
	Osjetljivost: 0.84	0.77	0.28	0.76
	Specifičnost: 0.40	0.43	0.82	0.35
	NPV: 0.72	0.63	0.51	0.56
	PPV: 0.46	0.59	0.61	0.56

Metabolički sindrom (Muškarci)	TSH Cutoff vrijednosti: 2.17 Osjetljivost: 0.77 Specifičnost: 0.42 NPV: 0.38 PPV: 0.80			
Metabolički sindrom (Žene)	1.3 0.83 0.35 0.78 0.43	1.3 0.83 0.35 0.78 0.43	145 0.52 0.61 0.43 0.69	16.4 0.53 0.53 0.67 0.39
Metabolički sindrom (Žene)	TSH Cutoff vrijednosti: 2.35 Osjetljivost: 0.61 Specifičnost: 1.00 NPV: 0.08 PPV: 1.00			

* označeno žutom bojom - vrijednosti >80% smatrane su važnima

HbA1c <7/≥7 - granična vrijednost koja ukazuje na dobru kontrolu glukoze prema međunarodnim smjericama

Prediktivna snaga (izražena kao AUC) za utvrđene granične vrijednosti IL-37 u razlikovanju između specifičnih podskupina dijabetičkih bolesnika, bilo uzetih samostalno ili u kombinaciji s drugim markerima upale, pokazala je umjereni intenzitet, i ni u jednom slučaju nije dosegla točnost od 80% (Tablica 15). Marker Hb je značajno bolji od markera NLR, uzetog kao osnova, u predikciji osoba s većim stupnjem komorbiditeta (>3), dok su se CRP i kombinacije toga markera s drugim upalnim markerima pokazale značajno boljim od NLR u razlikovanju dijabetičkih bolesnika s obzirom na normalnu/prekomjernu tjelesnu težinu (BMI <25/≥25 kg/m²).

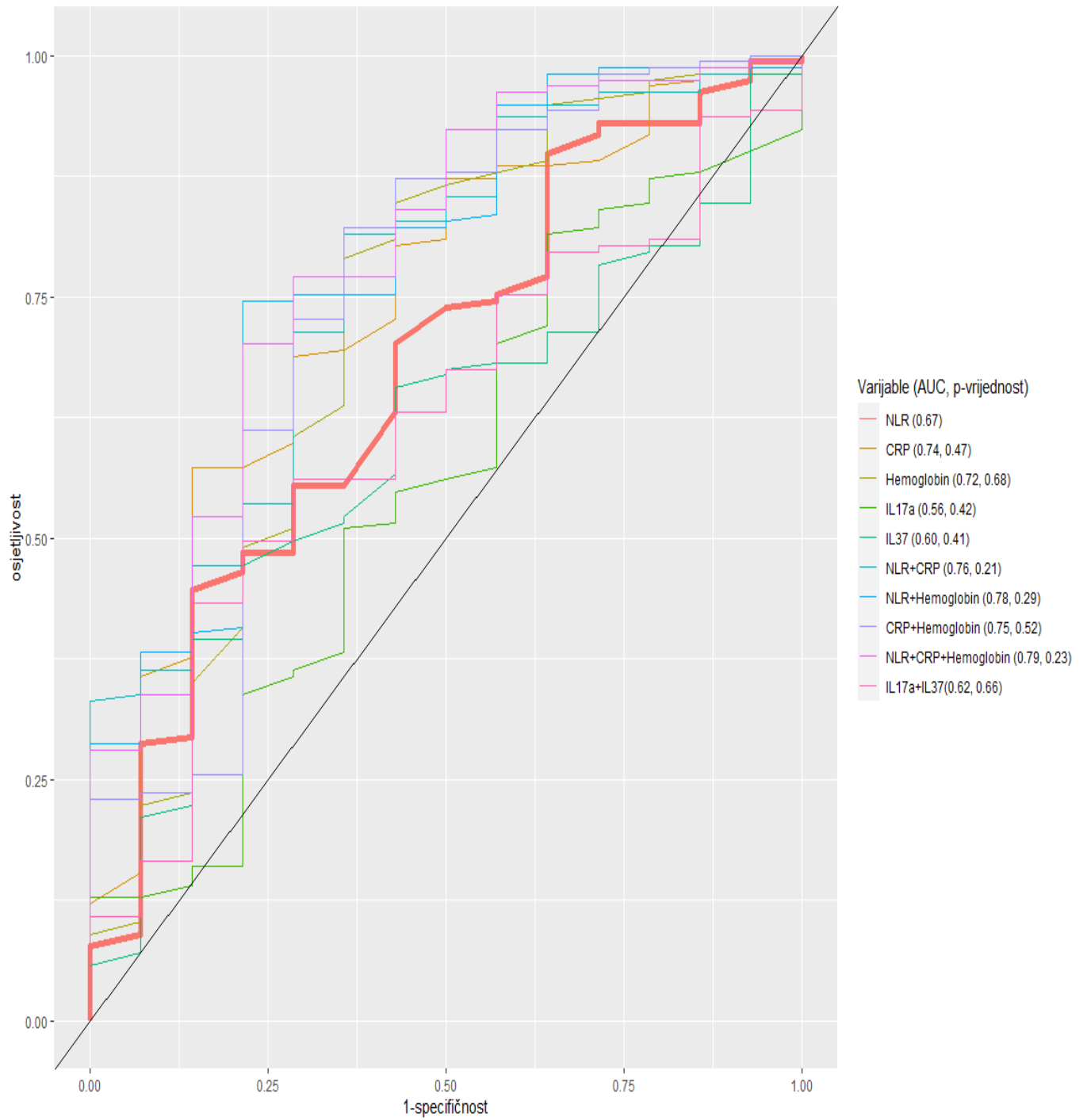
Tablica 15. Područje ispod ROC (AUC) za IL-37 i klasične markere upale: NLR, CRP i hemoglobin, te kombinacije markera. NLR se koristi kao osnova za usporedbu.

Podskupine	Upalni markeri i njihove kombinacije	AUC (NLR osnova)	p-vrijednost prema NLR
eGFR (mL/min/1.73 m ²) <45/≥45	IL-37	0.60	0.40
	NLR	0.67	
	Hb	0.72	0.68
	CRP	0.74	0.40
	CRP + Hb	0.75	0.52
	NLR + CRP	0.76	0.21
	NLR + Hb	0.78	0.29
	NLR + CRP + Hb	0.79	0.23
eGFR (mL/min/1.73 m ²) <60/≥60	Hb+IL-37	0.45	0.04
	CRP	0.49	0.11
	IL-37	0.54	0.36
	Hb	0.55	0.51
	CRP + Hb	0.55	0.51
	NLR	0.60	
	NLR + Hb	0.63	0.24
Frailty index 1 or 2 / 0	CRP	0.54	0.45
	NLR + Hb	0.54	0.41
	NLR + IL-37	0.56	0.63
	Hb + IL-37	0.57	0.70
	Hb	0.59	0.93
	NLR	0.60	
	IL-37	0.60	0.92
	CRP + Hb	0.61	0.76
	NLR + CRP + Hb	0.63	0.46
HbA1c % <7/≥7	Hb	0.56	0.92
	NLR	0.56	
	NLR+IL-37	0.58	0.48
	CRP	0.58	0.84

	IL-37	0.58	0.78
	CRP+Hb	0.60	0.61
	Hb+NLR	0.60	0.60
	CRP+IL-37	0.60	0.58
BMI kg/m ² <30/≥30	IL-37	0.50	0.87
	NLR	0.51	
	Hb	0.53	0.81
	NLR+Hb	0.53	0.38
	Hb+IL-37	0.54	0.67
	NLR+CRP	0.56	0.24
	CRP+Hb	0.58	0.25
	CRP	0.58	0.23
BMI (kg/m ²) <25/≥25	Hb	0.49	0.69
	NLR	0.53	
	NLR+IL-37	0.58	0.50
	IL-37	0.58	0.63
	NLR+CRP	0.78	0.01
	CRP+Hb	0.76	0.01
	NLR+CRP+Hb	0.77	0.01
	CRP	0.78	0.02
	CRP+IL-37	0.79	0.01
Dg. Kronične bolesi srca /NE	CRP	0.50	0.07
	Hb	0.61	0.90
	IL-37	0.61	0.95
	NLR	0.62	
	HB + IL-37	0.64	0.73
	NLR + Hb	0.65	0.35
Dg. Koronarna arterijska bolest/NE	CRP	0.52	0.32
	NLR	0.58	
	Hb	0.60	0.85
	CRP + Hb	0.60	0.83

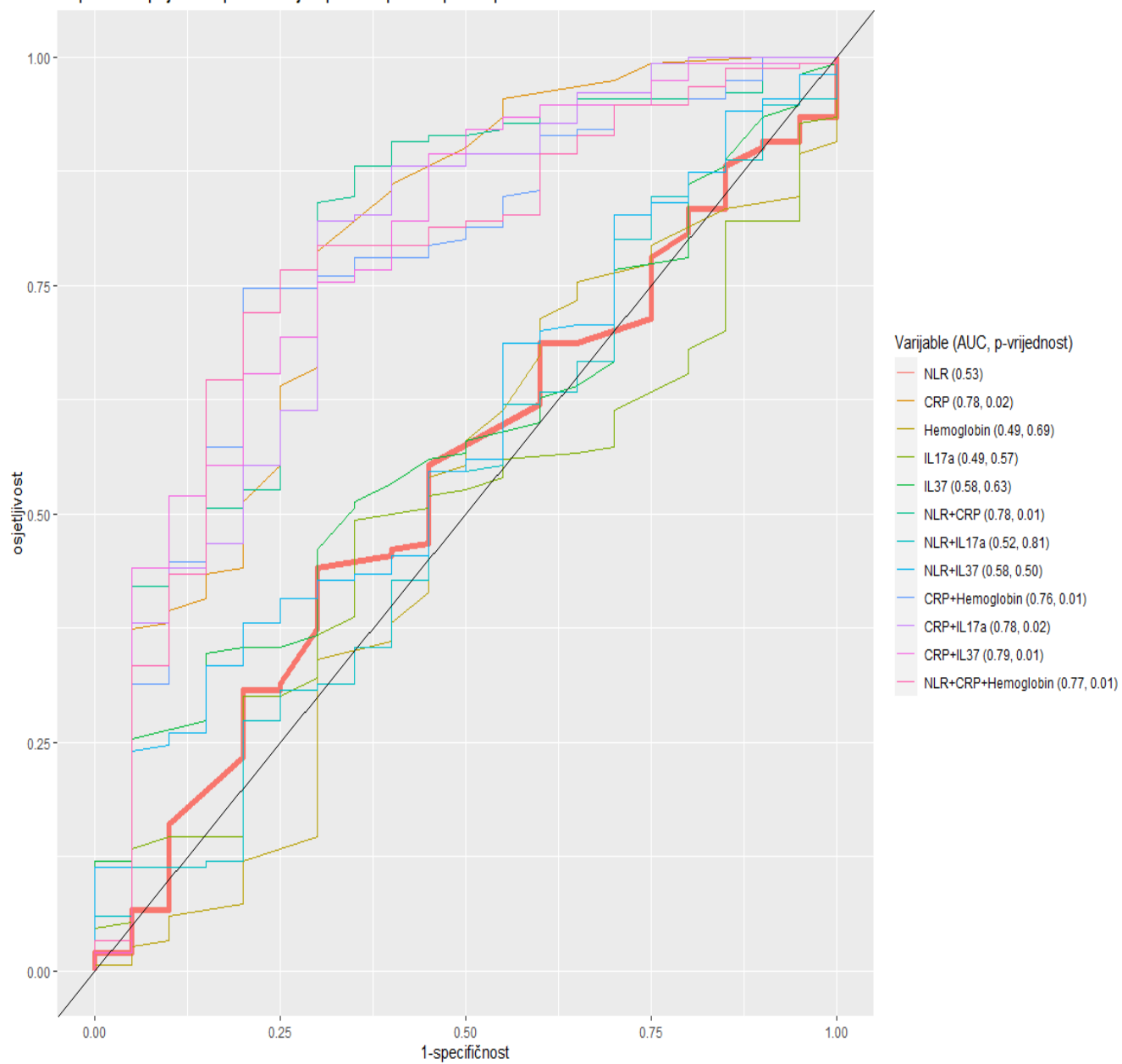
	NLR + Hb	0.63	0.28
	IL-37	0.66	0.23
	Hb + IL-37	0.66	0.24
Dg. Dijabetička retinopatija/ NE	CRP	0.53	0.35
	IL-37	0.55	0.56
	NLR + IL-37	0.59	0.81
	NLR + Hb	0.60	1.00
	Hb	0.60	0.86
	NLR	0.60	
Broj komorbiditeta >3 / ≤3	NLR	0.58	
	CRP	0.60	0.85
	NLR + CRP	0.66	0.22
	CRP + IL-37	0.66	0.24
	Hb	0.80	<0.01
Metabolički sindrom (Muškarci) / NE	IL-37	0.50	0.19
	Hb	0.53	0.69
	TSH	0.51	0.51
	CRP + TSH	0.55	0.59
	IL-37 + TSH	0.56	0.76
	Hb + IL-37	0.56	0.74
	CRP + Hb	0.57	0.90
	CRP	0.57	0.89
	NLR	0.58	
	NLR + TSH	0.58	0.97
	NLR + Hb	0.59	0.74
Metabolički sindrom (Žene) / NE	NLR	0.67	
	CRP	0.67	0.99
	CRP+Hb	0.70	0.95
	TSH+CRP	0.75	0.72
	Hb+IL-37	0.76	0.86
	NLR+Hb	0.78	0.65
	TSH+IL-37	0.82	0.50
	TSH+NLR	0.85	0.14

Usporedba pojedinih pokazatelja upale za podskupine ispitanika definirane kao eGFR <45/≥45



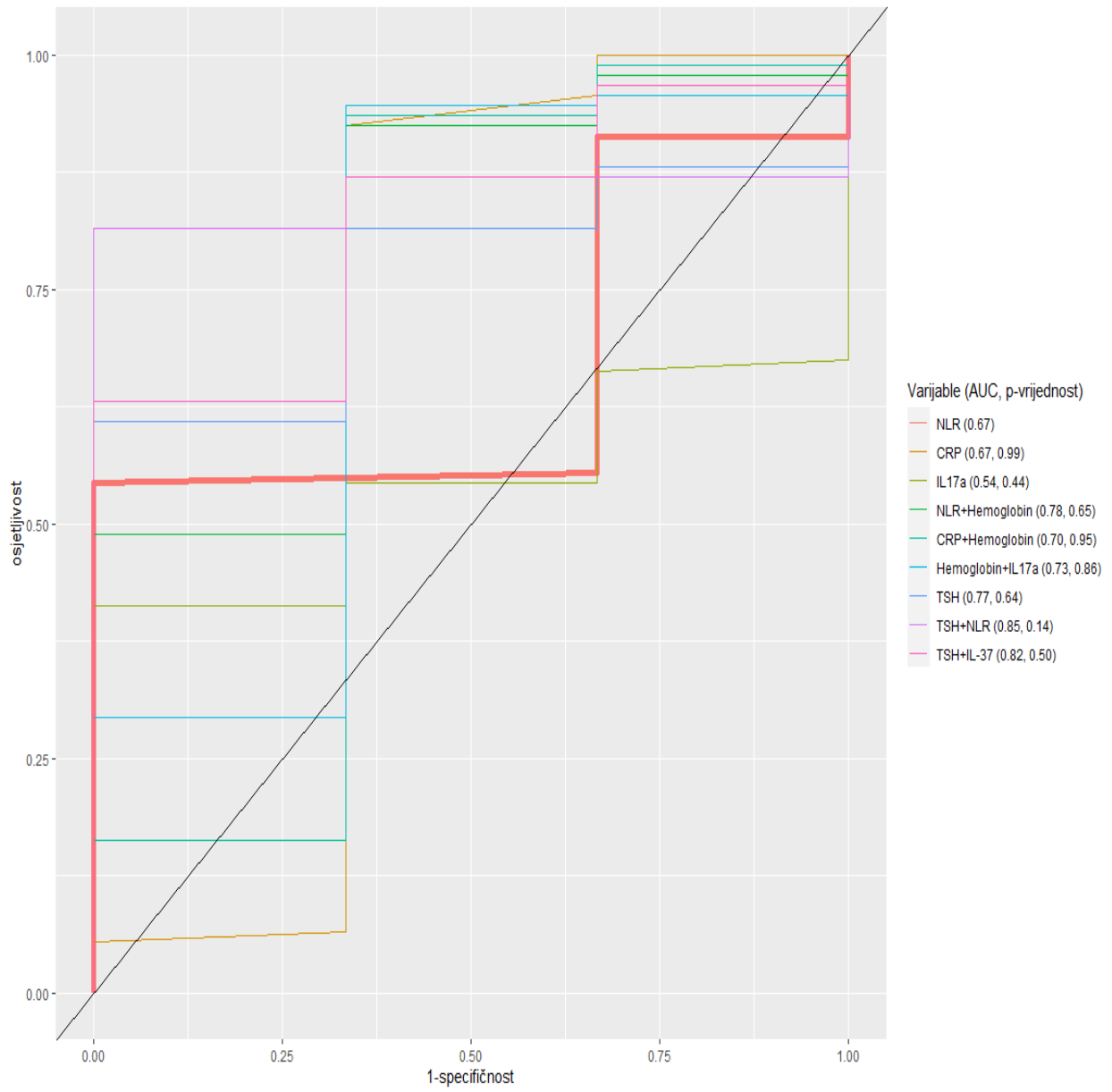
a)

Usporedba pojedinih pokazatelja upale za podskupine ispitanika definirane kao BMI <25/≥25



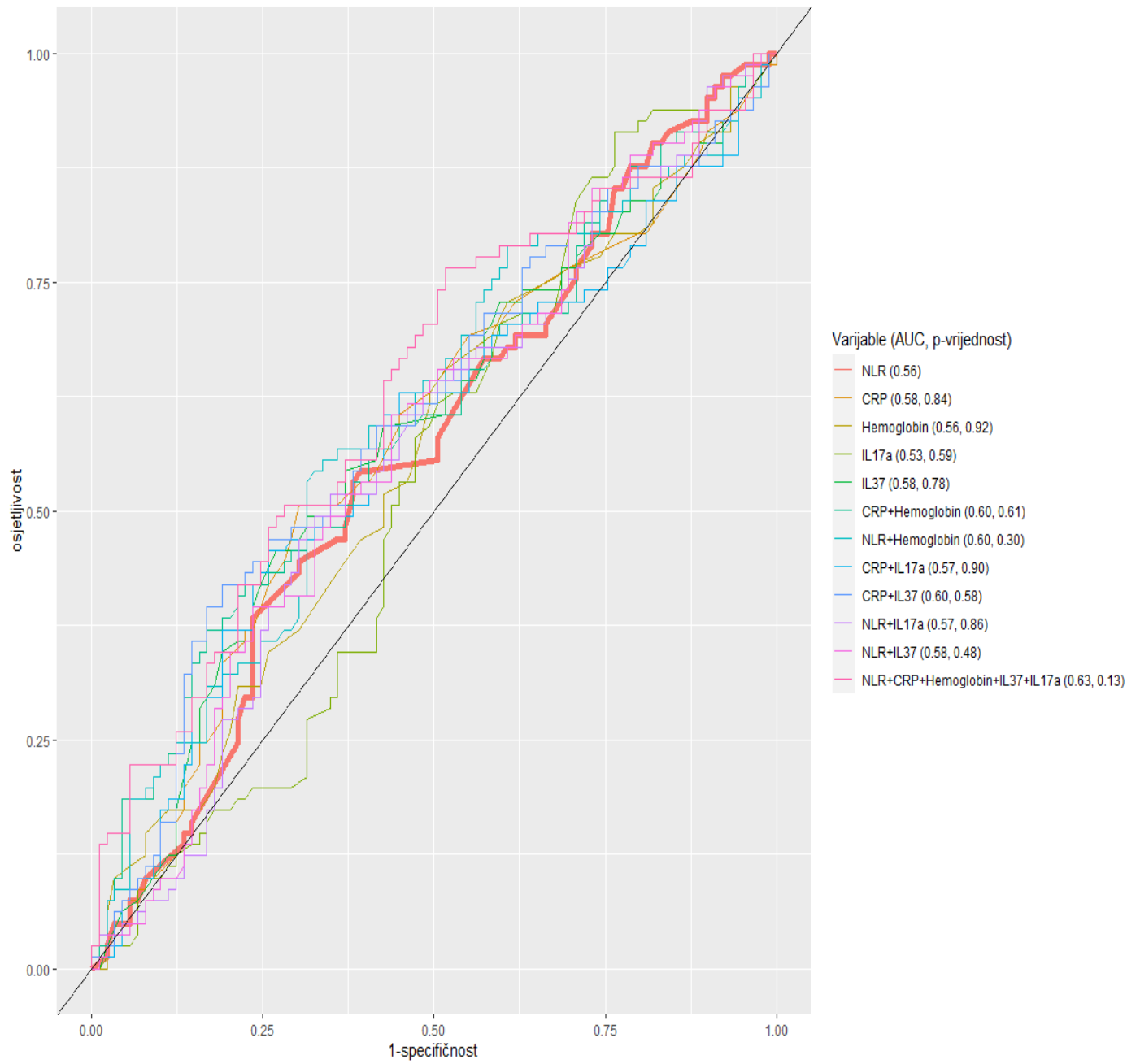
b)

Usporedba pojedinih pokazatelja upale za podskupine ispitanika definirane kao Metabolički sindrom postoji/ne postoji (ženski spol)



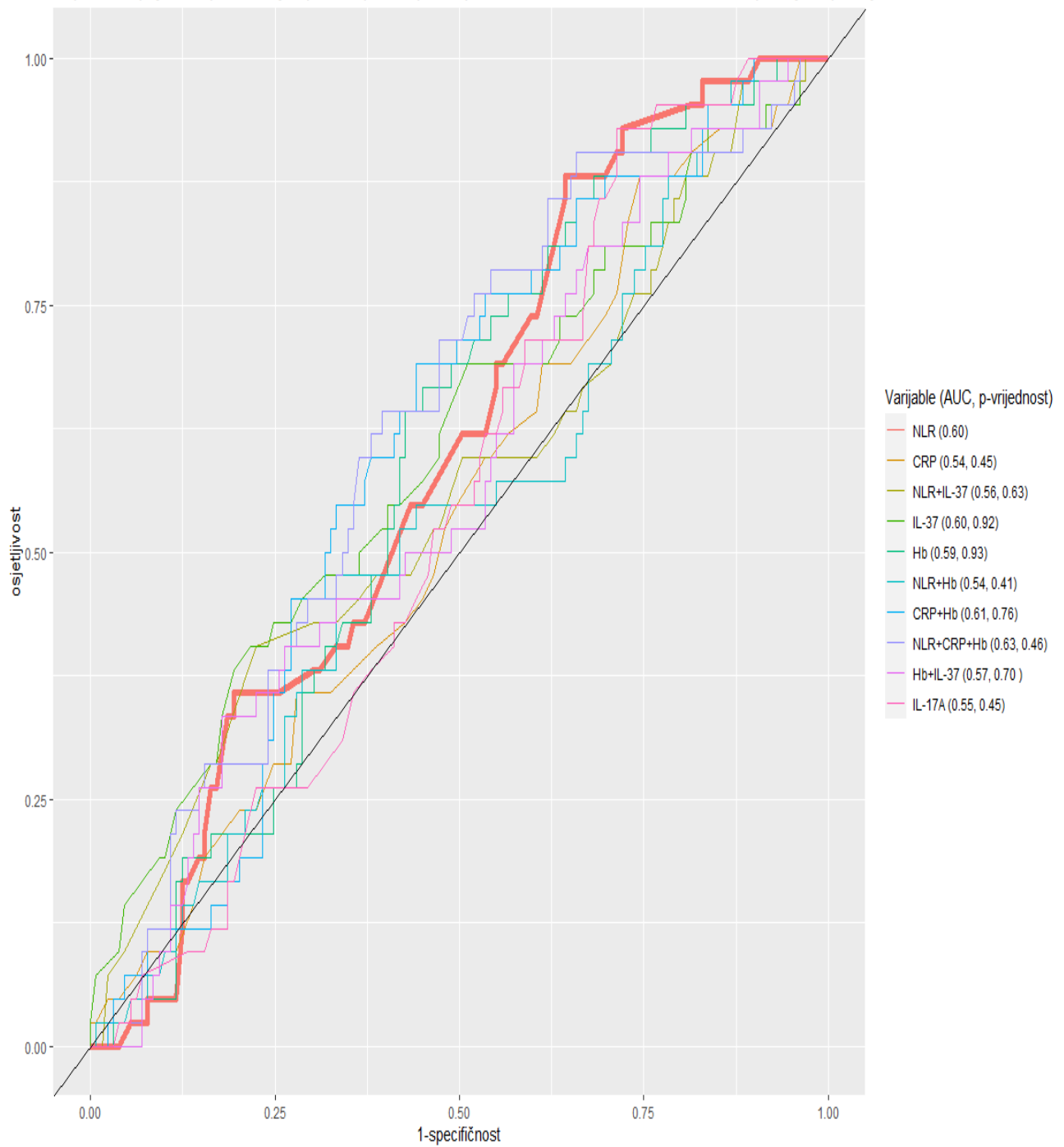
c)

Usporedba pojedinih pokazatelja upale za podskupine ispitanika definirane kao HbA1c <7/≥7

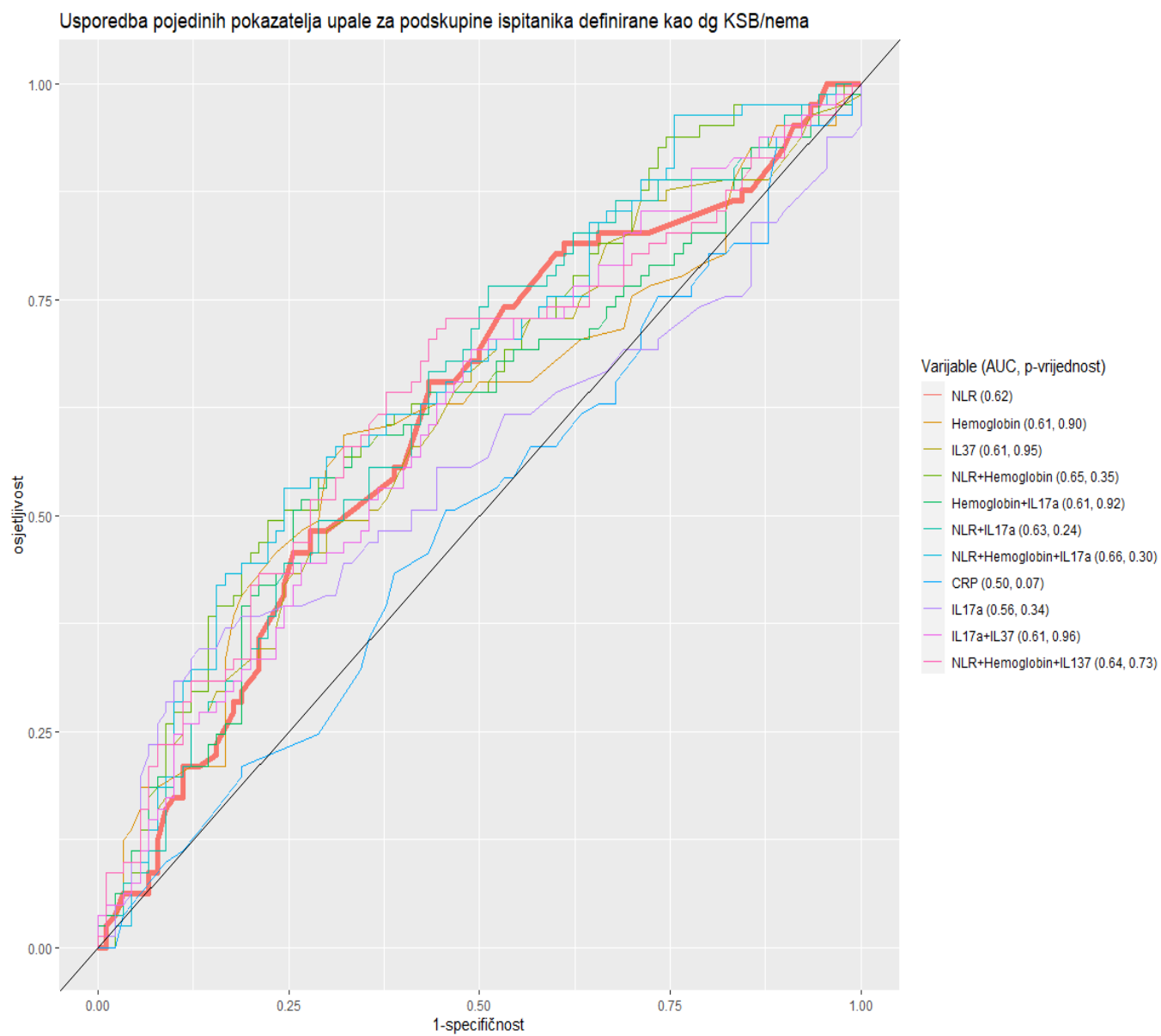


d)

Usporedba pojedinih pokazatelja upale za podskupine ispitanika definirane kao sindrom krhkost postoji/ne postoji



e)



f)

Slika 20. AUC upalnih markera za podskupine bolesnika s T2D : a), b), c), d), e), f)

5.4. Rezultati klaster-analize

Klaster analiza široko je primjenjivana metoda u biomedicinskim istraživanjima, a zbog svoje jednostavnosti i učinkovitosti, pokazala se korisnom u obradi velike količine podataka. Temelji se na razvrstavanju (grupiranju) podataka na osnovu sličnih karakteristika, s tim da se ti podaci međusobno razlikuju među grupama (klasama). Postoje različite klaster metode, a za potrebe obrade podataka korišten je k-means algoritam (za pregled, Majnarić LT i sur., 2021).

Klaster analiza uzima u obzir samo numeričke varijable, a broj odabranih varijabli iznosio je 30. Ponovili smo analizu za različite brojeve klastera ($3 \leq k \leq 6$) i promatrali rezultate zbroja kvadratnih pogrešaka (metoda koja pokazuje koliko su slični podaci u skupu jedni drugima) i vrijeme izvođenja za analize. Usporedili smo rezultate broja klastera generiranih jednostavnim algoritmom k-means i otkrili da se pogreška smanjuje kako se broj klastera povećava (Tablica 16). Ukupna kvadratna pogreška (SSE) je metoda koja pokazuje koliko su podaci u skupu slični jedni drugima. Na primjer, kada je vrijednost k 3, zbroj kvadrata pogreške iznosio je 2712, a kada se vrijednost k poveća na 6, nova vrijednost zbroja kvadrata pogreške iznosila je 2592 (Tablica 14). Rezultate smo dobili na temelju 6 klastera (Tablica 17) (Slika 21).

Tablica 16. Evaluacija klaster analize s 30 varijabli i 170 bolesnika

K vrijednost	Broj ponavljanja	Zbroj kvadrata pogrešaka unutar klastera
3	8	2712
4	7	2689
5	8	2593
6	7	2592

Tablica 17. Model sa 6 klastera (k= 6, 30 varijabli, N= 170), k- srednja vrijednos algoritam)

Varijable	Klaster 1	Klaster 2	Klaster 3	Klaster 4	Klaster 5	Klaster 6
Spol (M,Ž) (0,1)	0	1	0	1	0	0
Dob (godine)	61	64	72	80	67	61
Broj komorbiditeta (<3, ≥3) (0,1)	1	1	1	1	1	1
BMI (kg/m ²)	32	31.64	28.4	24.03	26	26.78
MAC(cm)	32	30	33	27	29	28
Hb (g/L)	157	142	123	134	129	162
eGFR (ml/min/1.73m ²)	79	87	29	59	59	58
eGFR stupanj (1-4)	1	2	3	3	2	1
TG (mmol/L)	1.5	1.2	1.2	1.9	2.1	1
HDL kolesterol (mmol/L)	1.3	1.2	1.2	1.2	1.5	1.6
TSH (mU/L)	2.1	2.2	2.39	3.3	1.9	2.2
CRP (mg/L)	1.1	0.9	0.6	0.8	1.1	1.2
Frailty indeks(0,1,2)	0	0	0	2	0	0
T2D trajanje (godine)	10	2	1	12	3	2
Hipertenzija (0=NE, 1=DA)	1	1	1	1	1	0
Hipertenzija trajanje (godine)	10	7	10	15	15	0
KSB (0=NE, 1=DA)	0	0	1	1	0	0
KAB (0=NE, 1=DA)	0	0	1	1	0	0
PAB (0=NE, 1=DA)	0	0	1	1	0	0
Osteoporoz (0=NE, 1=DA)	0	0	0	1	0	0
Osteroartritis (0=NE, 1=DA)	0	1	1	1	0	0
Križbolja	1	1	1	1	0	0

(0=NE, 1=DA)						
Anskioznost/depresija (0=NE, 1=DA)	1	1	1	1	0	0
DPP4 inh terapija (0=NE, 1=DA)	0	0	0	0	0	0
SGLT2inh terapija (0=NE, 1=DA)	0	0	0	0	0	0
GLP1RA terapija (0=NE, 1=DA)	0	0	0	0	0	0
inzulinska terapija (0=NE, 1=DA)	0	0	0	0	0	0
NLR	1.7	1.1	1	1.6	1.3	1.1
Il-17A (pg/mL)	1.53	0.68	0.01	0.68	1.47	1.42
Il-37 (pg/mL)	0.24	10.2	0.22	16.4	0.8	3.4

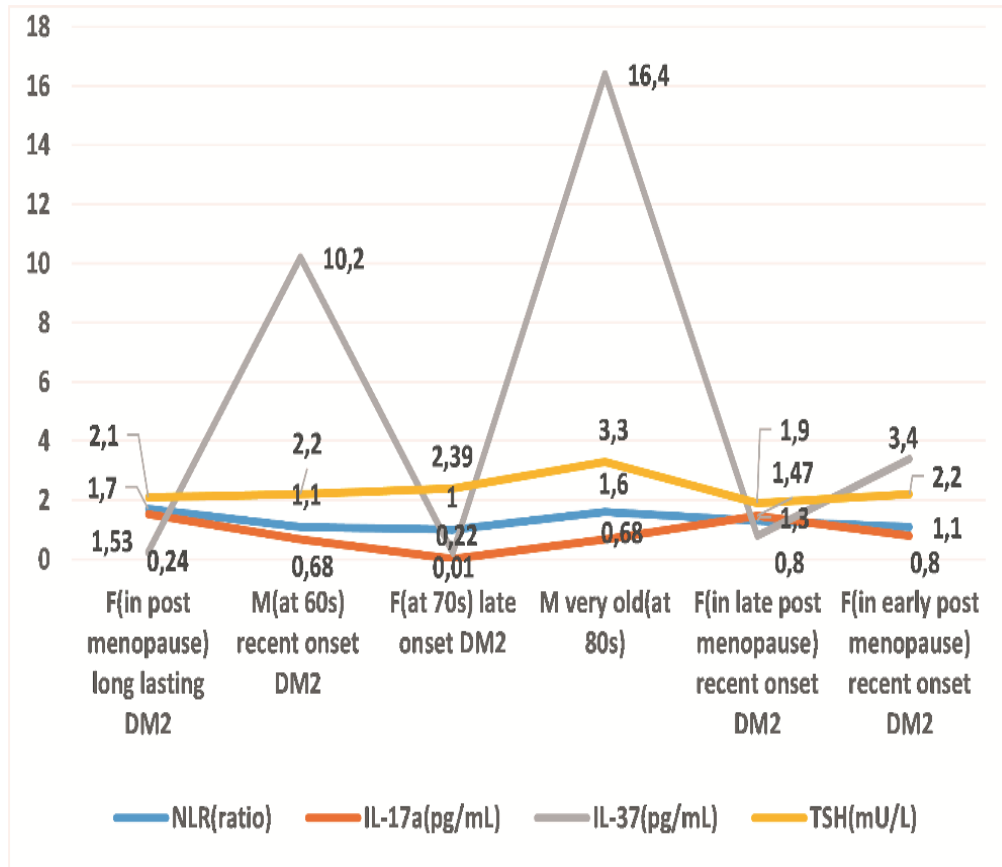
BMI – indeks tjelesne težine; Hb – hemoglobin; NLR - neutrophil-to-lymphocyte ratio; eGFR - estimated glomerular filtration rate; TSH - thyroid-stimulating hormone; CRP – C- reactive protein; DT2. Dijabetes tipa 2; KSB- kronična srčana bolest; KAB- koronarna arterijska bolest; PAB- periferna arterijska bolest; DPP4inh – eng. (dipeptidyl peptidase-4 inhibitor); SGLT2inh – eng. (sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors); GLP1r – eng. (glucagon-like peptide-1 receptor agonists).



Cl1 – cluster; DM2 – diabetes mellitus type 2; BMI – eng. body mass index; mac – eng. mid-arm circumference; CV – eng. cardiovascular; O-A – eng. osteoarthritis; eGFR – eng. estimated glomerular filtration rate

Slika 21. Socio-demografski i klinički kontekst ispitivanja u 6-klasternom modelu.

Preuzeto i prilagođeno uz dozvolu autora Bosnić Z, i sur. 2021.



Slika 22. Grafički prikaz vrijednosti upalnih biljega omjera neutrofila i limfocita (NLR) , IL-17A, IL-37 i hormona TSH po klasterima u 6-klaster modelu

Preuzeto i prilagođeno prema Bosnic Z, i sur. 2021.

Također, primijenili smo i multivarijatnu linearnu regresijsku analizu (MLR) za varijable NLR, IL-17A i IL-37 kao zavisne varijable, a regresijski modeli prikazani su u tablici 18. MLR modeli predstavljeni u tablici 18 ukazuju na varijable koje značajno koreliraju s bilo kojim od ovih novih upalnih markera, uključujući NLR i citokine IL-17A i IL-37. Svim modelima je bilo zajedničko da su svi ovi markeri povezani sa sniženjem stupnja bubrežne funkcije te međusobno, ali su smjerovi tih povezanosti bili različiti. To se može objasniti na primjeru kada su vrijednosti markera NLR i IL-17A bile više u nižim stupnjevima (u odnosu na više stupnjeve) opadanja bubrežne funkcije, dok su vrijednosti markera IL-37 nasuprot tome, rasle kako su stupnjevi opadanja bubrežne funkcije postajali viši (viši stadiji opadanja, porast IL-37 s gubitkom ekskrecijske funkcije bubrega.). Marker NLR bio je pozitivno povezan s citokinom IL-17A, ali negativno s citokinom IL-37. Citokini IL-17A i IL-37 bili su pozitivno povezani jedan s drugim, premda ne i tijesno povezani jedan s drugim s tim da su plazmatske koncentracije citokina IL-37 bile puno više ovisne o razinama citokina IL-17A. Također je potrebno istaknuti da su o ovim modelima povećanje BMI i neki komorbiditeti, poput osteoartritisa, utjecali na porast vrijednosti NLR-a, ali nisu utjecali na druga dva markera upale. Jedino NLR pokazuje spolno-ovisnu povezanost. Također je zanimljivo i da je tip dislipidemije povezane s metaboličkim sindromom i inzulinskom rezistencijom, koji se predstavlja povišenim trigliceridima i sniženim HDL kolesterolom, pozitivno povezan samo s IL-37, dok su, naprotiv NLR i IL-17A bili viši kada nije bilo znakova metaboličkog sindroma. Nadalje, vidljivo je da je kinetika NLR i IL-37 povezana s aktivacijom osovine hipotalamus-hipofiza-štitnjača, što se predstavlja varijablom TSH te da je ta povezanost puno jača u slučaju IL- 37.

Tablica 18. Multivarijatna linearna regresijska analiza za varijable NLR, IL-17A i IL-37 kao zavisne varijable (regresijski koeficijenti i jednadžbe)

NLR	IL-17A	IL-37
-0.2602 * spol +		
0.0156 * BMI kg/m2+		
-0.0077 * eGFR U ml/min/1.73m2 +	0.0584 * dob u godinama +	17.377 * eGFR stupnjevi +
-0.058 * eGFR stupanj +	-1.1963 * eGFR stupnjevi +	-0.883 * HDL +
-0.0813 * Trigliceridi +	0.0459 * HDL +	-6.4164 * TSH +
-0.081 * TSH +	0.3422 * CRP +	-4.9867 * CRP +
0.0182 * CRP +	0.0385 * IL-37 +	17.3077 * IL-17A +
0.3491 * osteoartritis +	-0.8856	-15.2037
0.0149 * IL-17A +		
-0.0007 * IL-37 +		
2.2697		

BMI –indeks tjelesne mase; NLR – omjer neutrofila i limfocita; eGFR – eng. estimated glomerular filtration rate; TSH – tireostimulirajući hormon; CRP – C- reaktivni protein; HDL – HDL kolesterol; IL-17A I IL-37 - citokini.

6. RASPRAVA

Ubrzano starenje populacije donosi sa sobom porast kroničnih bolesti, a koje i čine najveći dio opterećenja bolestima nekog društva te su i najvažniji uzroci mortaliteta (Eurostat, 2021). Za razliku od akutne upale, čiji je tijek dobro poznat, faze kronične upale povezane sa starenjem i razvojem oštećenja organa povezanih s kroničnim bolestima starenja, slabo su poznate, iako su izolirani mehanizmi koji sudjeluju u tim procesima identificirani u eksperimentalnim studijama (Medzhitov, 2010; Chen i sur., 2017). Prisutnost kroničnih bolesti svojim mehanizmima ubrzavaju proces starenja i skraćuju životni vijek, zbog čega se na starenje i na razvoj kroničnih bolesti može gledati kao na niz alternativnih vremenskih putanja (trajektorija) istog procesa, ali koji se odvija po različitim stopama ubrzanja, što je rezultat interakcije između genetskih, epigenetskih i okolišnih čimbenika te načina života. Međutim, te putanje, kao i fenotipska obilježja osoba na pojedinim putanjama, nisu još poznate. Brojni su dokazi iz observacijskih i molekularno-bioloških istraživanja, koji govore u prilog da kronične bolesti čija se učestalost povećava sa starenjem, kao što su T2D, ateroskleroza, KVB, osteoporoza, demencije i neke maligne bolesti, dijele zajedničke patofiziološke mehanizme s procesom starenja, no razlika je samo u brzini razvoja tih promjena (Franceschi i sur., 2018). Pretpostavlja se da mehanizmi kronične upale pokazuju dinamiku promjena koje prate napredovanje oštećenja ciljnih organa, kao i pad entropije cijelog tijela (Franceschi i sur., 2018; Franceschi C i sur., 2018).

S obzirom da je jasno da je upala uključena u patofiziologiju KVB, upalni biljezi su se pokušavali primijeniti u stratifikaciji rizika i predviđanju u bolesnika s KV čimbenicima rizika i KVB (Ridker i sur., 2003). Smatralo se da je to korisna strategija naročito u starijoj populaciji u kojoj je primijećeno slabljenje odnosa između klasičnih KV čimbenika rizika i štetnih KV događaja (Whelton i sur, 2013). Također utvrđeno je da primjena nekih klasičnih upalnih markera, kao što su IL-6, CRP, TNF- α i serumski albumin, razlikuje status krhkosti od ozbiljnijih zdravstvenih stanja (Amblàs-Novellas i sur., 2021). Ipak, utvrđeno je da su prediktivne vrijednosti ovih klasičnih upalnih markera skromne ili nije postojao konsenzus o njihovoj valjanosti kao prediktivnih ili diskriminacijskih čimbenika (Alberro i sur., 2021; Kritharides, 2009). Ranije se razmatrala i klinička valjanost upotrebe kombinacija više upalnih markera ili biomarkera koji ukazuju na različite putove bolesti (Zethelius i sur., 2008).

6.1. Rasprava glavnih rezultata

Jedan od ciljeva u ovom doktorskom radu bio je identificirati obrasce upalnih markera koji su uključeni u određene kliničke kontekste u starijih pacijenata s kardio-metaboličkim bolestima. Iz tog razloga, a s ciljem bolje evaluacije prediktivne vrijednosti, pokušala se rasvijetliti uloga IL-17A i IL-37 u tim procesima, kao potencijalno novih upalnih biljega i novih bioloških lijekova.

Dosadašnja znanja o IL-17A stečena u zadnjih 10-tak godina putem proučavanja životinjskih modela i staničnih kultura ukazuje da IL-17A ima važnu ulogu u KV sustavu jer posreduje u razvoju upale tkiva ciljnih organa i remodeliranju tkiva na više razina (Yuan i sur., 2015; Schüler i sur., 2019; Rodrigues-Diez i sur., 2021). Ipak, još uvijek ostaje nepotpuno shvaćena biološka uloga IL-17A, te uključenost ovog citokina u različite homeostatske (regulacijske) i patološke puteve, jer su koncentracije u krvi često nedosljedne u dosada provedenim usporednim (eng. *Case-Control*) kliničkim studijama (Bechara i sur., 2021). To je vidljivo na primjeru mjerenja IL-17A u cirkulaciji pacijenata s T2D i pacijenata bez T2D, kod kojih ponekad nije uočena značajna razlika (Kong i sur., 2022). Kao moguće objašnjenje navodi se dvojaki učinak IL-17A od kojih jedan, ovisno o kontekstu, može prevladavati. Prvi je učinak IL-17A na indukciju proupalnih citokina, što se nalazi u podlozi povezanosti povećane koncentracije IL-17A u serumu pacijenata s inzulinskom rezistencijom i povezanim metaboličkim poremećajima, uključujući povećanu serumsku razinu glukoze i dislipidemiju (Bechara i sur., 2021; Chehimi i sur., 2017). Takva situacija može biti u slučaju obilne infiltracije masnog tkiva ili ciljnih organa T-stanicama koje proizvode IL-17A, u stanjima kao što su pretilost, hipertenzija, T2D i KVB. Nasuprot ovom stanju, opisana je situacija u kojoj postoji dominantna regulatorna uloga IL-17A na metabolizam glukoze, što se može različito odražavati na aktivnost imunskih i neimunskih stanica te na stupanj samoodržanja, reparacije ili oštećenja pojedinih tkiva. Mogući mehanizmi uključuju supresiju adipogeneze, regulaciju termogeneze, i međusobnu komunikaciju između mezenhimalnih stanica masnog tkiva i rezidentnih $\gamma\delta$ -T stanica koje proizvode IL-17A u pogodovanju ekspanziji ST2+Treg stanica, nakon čega slijedi povećano izlučivanje protu-upalnih citokina, poput IL-4, IL-10 i IL-33, koji zauzvrat mogu ublažiti metaboličke učinke proupalnih citokina (Bechara i sur., 2021; Kong i sur., 2022). Posljedično tome, IL-17A ima ulogu i u poticanju fibroznih procesa, prvenstveno kroz indukciju prototipskog fibrogenog faktora TGF- β (Bechara i sur., 2021). Ipak treba naglasiti da stupanj fibroze može varirati među tkivima i

organima, ovisno o fazama oštećenja određenih organa, što može utjecati i na varijacije u cirkulirajućim razinama IL-17A među pacijentima s T2D. U tom pogledu, dokazi dobiveni na životinjskim modelima pokazuju da količina stanica koje induciraju IL-17A, a koje su se infiltrirale u ciljni organ kao što su bubrezi, nije povezana s cirkulirajućim razinama IL-17A (Lavozi i sur., 2020). U humanima studijama zabilježeni su nedosljedni rezultati u vezi s razinama IL-17 u serumu i težinom bolesti bubrega. Općenito, za IL-17A je dokazana njegođa pleiotropna funkcija koja je ovisna o kontekstu tako da ishodi mogu varirati u pojedinim fiziološkim i patološkim stanjima, što ovisi ne samo o vrsti stanica prisutnih u tkivu i njihovoj osjetljivosti na djelovanje IL-17A, nego i o zbiru sinergističkih i antagonističkih signala od drugih citokina prisutnih u mikrookolišu (Bechara i sur., 2021).

U okviru toga opisanog konteksta djelovanja IL-17A, moguće je razumjeti dobivene rezultate istraživanja provedenog za potrebe izrade doktorskog rada, koji su pokazali da učestalost ili jačina povezanosti određenih čimbenika koji opisuju karakteristike bolesnika ne prate linearno tendenciju porasta serumskih vrijednosti IL-17A (izraženih kao kvartile). To je vidljivo na primjeru gdje je uočena povezanost IL-17A s markerima dislipidemije, koja je vidljiva samo u kvartilima s IL-17A nižeg stupnja. To se može objasniti činjenicom da je tek manji udio sudionika bio bez MS-a. To je i očekivano, budući da će bolesnici bez MS-a, u usporedbi s onima koji boluju od MS-a, imati niže vrijednosti plazmatskih lipidnih biljega i tek umjereni kardiovaskularni rizik, pri čemu se očekuje i niža razina upale, izražena nižim kvartilama serumskih razina IL-17A (Chang i sur., 2021; Cosentino i sur., 2020). Da doista postoji nezavisan nelinearni odnos između ispitivanih varijabli i cirkulirajućeg IL-17A, potvrđuje i podatak da su regresijski modeli usklađeni s obzirom na dob bolesnika i trajanje T2D, a oba čimbenika imaju utjecaja na razinu IL-17A u serumu (Bechara i sur., 2021). Naime, veći rizik od KVB može se očekivati u bolesnika s T2D koji su starije dobi i koji duži niz godina boluju od T2D, a sukladno tome se u njih pretpostavlja i veći stupanj sistemske upale (Zoungas i sur., 2014). Osim toga, ta razlika u KV riziku i izraženosti KV čimbenika rizika između ispitanika čini da postoji taj nelinearni odnos između ispitivanih varijabli i cirkulirajućeg IL-17A.

Osim dužine trajanja bolesti, veliku ulogu ima i modalitet liječenja. U nedavnoj studiji provedenoj na pacijentima s T2D dobra kontrola razine glukoze u krvi povećala je broj cirkulirajućih Treg stanica, dok se s duljim trajanjem T2D taj broj smanjio (Guzmán-Flores i

sur., 2020). Za dva antidiabetička lijeka, koji su selekcionirani u regresijskim modelima, dokazi ukazuju na njihovu povezanost s imunološkim i metaboličkim učincima posredovanim IL-17A. Primjerice, liječenje s inhibitorom DPP-4 sitagliptinom smanjilo je broj i postotak cirkulirajućih Th17 i Treg stanica što je vjerojatno povezano s činjenicom da je DPP-4 površinski marker Th stanica te je izravno uključen u njihovu diferencijaciju i proliferaciju (Aso i sur., 2015). Drugi antidiabetik, pioglitazon, sintetski inhibitor transkripcijskih čimbenika PPAR, također je pokazao ulogu u metaboličkim putovima pa tako i onima koji su uključeni u diferencijaciju Th17 i Treg limfocita (Tian i sur., 2017).

Kada se osvrnemo na povezanost između serumske razine HbA1C, kao markera kontrole glikemije, i cirkulirajuće razine IL-17A, vidljiv je gubitak povezanosti između ova dva biomarkera, što se može objasniti time da su vrijednosti HbA1C ujednačane među kvartilama IL-17A. To može biti rezultat nepovoljnog utjecaja na kontrolu glukoze u krvi i razine HbA1c uslijed povećanog broja komorbiditetnih stanja, dok s druge strane, povoljnog utjecaja medikamentoznog liječenja, čineći tako HbA1c posredničkom varijablom u povezanosti između navedenih čimbenika i cirkulirajućih razina IL-17A (Cosentino i sur., 2020; Strain i sur., 2021 ; Pothier i sur., 2022). Rezultati regresijskih modela sugeriraju takav kontekst povezan s IL-17A.

6.2. Rasprava mehanizama s naglaskom na regresijske modele

Razumijevanje kompleksnosti T2D u starijih osoba može nam pomoći u razumijevanju rezultata regresijskih modela, a vezano za slučaj gdje nije bilo značajnih povezanosti između KVB i varijacija u serumskim vrijednostima IL-17A, iako je analiza razlika sugerirala takvu mogućnost. Takav rezultat je u suprotnosti s dokazima koji ukazuju na visoko preklapanje između T2D i KVB, a na temelju zajedničke patofiziološke pozadine, koja uglavnom podrazumijeva povećanu upalu i inzulinsku rezistenciju (Nwaneri i sur., 2013 i Roden i sur., 2019). S obzirom na to da je T2D kompleksna bolest, za očekivati je da postoje razlike između bolesnika prema jačini izraženosti pojedinih entiteta KVB, kao što je npr. KBS, za koji je poznato da varira u intenzitetu i učestalosti, kada se uspoređuju rane faze poremećaja metabolizma glukoze, s kasnim stadijima progresije T2D (Bekić i sur., 2021; Wu i sur., 2021).

Nadalje, postojanje spolne pristranosti na ekspresiju KVB i s njima povezanih metaboličkih i upalnih puteva, kao što pokazuju dokazi, a i rezultati regresijskih modela (model "A"), mogao je

utjecati na nedostatak povezanosti između KVB i varijacija u serumskim koncentracijama IL-17A (Connelly i sur., 2021). U svome preglednom radu, Trtica Majnarić i sur. ukazali su da su spol i dob pacijenta vjerojatno odgovorni za varijacije u parametru NLR kada se koristi kao marker upale kod KVB, a što je moguće da je odraz razlika u intenzitetu upalnog odgovora u ciljnim organima i tkivima, ako se promatraju na razini tijela (što odražavaju i varijacije u cirkulirajućem IL-17A) (Trtica Majnarić i sur. 2021). Tvrdnju o utjecaju dobi i spola na varijacije u stupnju sistemske upale podupiru i rezultati ove studije (model "A"), gdje je kao parametar u modelu koji pokazuje značajnu povezanost s IL-17A selekcioniran hemoglobin, koji je pokazatelj stupnja upale kao rezultata ukupnog tereta komorbiditeta, a također je i marker krhkosti (Pothier i sur., 2022).

Važno je naglasiti da sistemska razina IL-17A u bolesnika s T2D ne odražava upalni status i stupanj smanjenja funkcije pojedinačnog ciljnog organa, nego zbira organa i tkiva te je i rezultat aktivnosti regulatornih mehanizama na sustavnoj razini. To je i mogao biti razlog što su se u eksperimentalnim modelima dijabetičke nefropatije i kliničkim studijama koje su uspoređivale stupanj narušenosti bubrežne funkcije i razinu cirkulirajućeg IL-17A rezultati mjerenja pokazali nedosljednima (Kong i sur., 2022; Lavozi i sur., 2020). Ti podatci pomažu razumjeti i na prvi pogled kontradiktorne rezultate dobivene u ovome istraživanju, a koji ukazuju na nedostatak povezanosti između pada bubrežne funkcije i cirkulirajućeg IL-17A.

Kada je riječ o citokinu IL-37, dosadašnja istraživanja su pokazala da je to snažan prirodni supresor urođene i stečene imunosti (Dinarello i sur., 2016). Njegova abnormalna ekspresija primijećena je u autoimunim i imunološki posredovanim upalnim bolestima, kao što su upalna bolest crijeva, reumatoidni artritis, sistemski eritematozni lupus, astma, multipla skleroza, ankilozantni spondilitis, psorijaza i Gravesova bolest, što ukazuje na mogućnost i terapijske primjene IL-37 u navedenim bolestima (Xu i sur., 2015). U eksperimentalnim istraživanjima na životinjskim modelima, primijećeno je da IL-37 dovodi do promjena u metaboličkim putevima i postranslacijskih modifikacija histona u stanicama monocita/makrofaga, čime se smanjuju istrenirane karakteristike navedenih stanica (Cavalli i sur., 2021). Slijedom navedenog, došlo je do pretpostavke da se IL-37 može uspješno koristiti u dijagnostici i liječenju kardio-metaboličkih bolesti. Istraživanja na životinjskim modelima s multiplom sklerozom koji su liječeni s citokinom IL-37, pokazala su da se poboljšava osjetljivost na inzulin i smanjuje proizvodnja proupalnih

citokina (Ballak i sur., 2018). Na osnovu dobivenih rezultata, a zahvaljujući značajnom tehnološkom napretku, sve više se razmatra i opcija liječenja agensima na bazi citokina (Findeisen i sur., 2021; Velikova i sur., 2021). Eksperimentalna istraživanja na životinjskim modelima pokazala su da IL-37 smanjuje oštećenje glomerula izazvano visokom razine upale posljedično povišenim razinama glukoze i oksidativnog stresa u tkivu bubrega (Zhang X i sur., 2020). Uočeno je također da povećana ekspresija IL-37 štiti od ateroskleroze i nestabilnosti plaka, a potiče i poboljšanje remodeliranja srca nakon infarkta miokarda (Zhu i sur., 2016; Liu i sur., 2018). Unatoč svemu, nedostatne su kliničke studije u kardio-metaboličkim stanjima u kojima su mjerene razine IL-37, i nije jasno u kojim okruženjima i u kojim skupinama pacijenata razine IL-37 pokazuju tendenciju povećanja ili smanjenja, te koja je prognostička vrijednost ove dinamike (Ye i sur., 2021; Liu i sur., 2021).

Nejasnoćama pridonosi i činjenica da su rezultati vezani za IL-37 na eksperimentalnim miševima posljedica njegove transgene ekspresije, jer miševi ne posjeduju ortolog IL-37 gena.

Dobiveni rezultati istraživanja za potrebe izrade doktorskog rada pokazuju veću varijabilnost serumskih razina IL-37, u rasponu od vrlo niskih, jedva mjerljivih vrijednosti do vrijednosti koje su dvostruko veće od onih opisanih za zdravu populaciju odraslih (Santarelli i sur. 2021).

Ipak, kod većine ispitanika su izmjerene niske vrijednosti i pristrano raspoređene prema medijanu od 13,40 pg/mL, krećući se u rasponu od 3,40-38,00 pg/mL. Samo u Q4 je vidljiva tendencija strmog porasta vrijednosti po čemu distribucijska krivulja poprima ne-linearni „J“ oblik. Takva distribucija ukazuje na prilično značajnu heterogenost ispitanika obzirom na cirkulirajuće vrijednosti IL-37. To se može objasniti činjenicom da je T2D kompleksna bolest, što sugerira i veći broj komorbiditetnih stanja koji mijenjaju opseg i intenzitet usporedno s progresijom bolesti i dobi bolesnika, a utječu i na patofiziološke putove i kliničku ekspresiju ove bolesti (Bellary i sur., 2021; Roden i sur., 2019). Poznato je da razvoj dijabetičkih komplikacija, posebno u vezi s KVB i zatajenjem bubrega, kao i porast u dobi, ubrzavaju razvoj negativnih gerijatrijskih sindroma, kao što su sarkopenija, pothranjenost i krhkost, što može dodatno smanjiti homeostatske rezerve pojedinca i kompenzacijske reakcije, uključujući tako i IL-37 (Kleipool i sur., 2018; Nixon i sur., 2018).

Jedno od mogućih objašnjenja za vrlo niske cirkulirajuće vrijednosti IL-37 kod dijela ispitanika, mogla bi biti dobra kontrola glikemije u većine od njih (interkvartilni raspon vrijednosti HbA1c

od 5,2-7,7%), što je unutar preporučenih granica za dijabetičke bolesnike starije dobi s komorbiditetima (Cosentino i sur. 2019). Međutim, ne može se znati jesu li niske cirkulirajuće vrijednosti IL-37 rezultat slabog upalnog podražja ili smanjenog protu-upalnog kompenzatornog odgovora. Potonje može biti posljedica iscrpljenja homeostatskih mehanizama, usljed napredovanja oštećenja organa i razvoja vaskularnih komplikacija. Druga mogućnost je postojanje urođeno slabijeg protu-upalnog odgovora, koji je i mogao biti u podlozi predispozicije pojedinih osoba za nastanak T2D. Na tu mogućnost ukazuju rezultati nedavno objavljene epidemiološke studije, u kojoj su utvrđeni određeni genski polimorfizmi gena za IL-37 povezani s prisustvom KV čimbenika rizika i T2D (López-Bautista i sur., 2020).

Moguće su i neke druge genetske varijacije, koje bi mogle biti u podlozi varijabilnih vrijednosti IL-37, izmjerenih u ovome radu, iako su saznanja o tome još mala. Tako je npr. poznato da postoji pet različitih izomera molekule IL-37, čija različita ekspresija kod pojedine osobe bi mogla utjecati na razlike u serumskoj koncentraciji i specifičnim učincima IL-37 (Yan J i sur., 2017).

Varijabilnost može postojati i na razini tzv. „mikro“ RNA (miRNA) – regulatorne nekodirajuće RNA, koja regulira stupanj transkripcije gena za IL-37 te i post-translacijske promjene genskih transkripata toga citokina (Wang P i sur., 2019). Utvrđeno je da rijetki genski polimorfizam može doprinijet predispoziciji nekih osoba za nastanak gihta (Klück i sur., 2020).

Potrebno je naglasiti i to da je način regulacije citokina, posebno IL-37, kao dijela kompenzacijskih mehanizama, puno kompleksniji u stanjima kroničnih bolesti starenja kao što je T2D, gdje se osobe s istim dijagnostičkim kodom međusobno preklapaju u patofiziološkim putevima i predstavljaju različitim fenotipovima, nego u autoimunim i nekim upalnim bolestima, koje su rezultat manjeg broja genetskih ili okolišnih čimbenika, ali velikog stupnja utjecaja, pa su i puno homogenije u kliničkom predstavljanju (Bellary i sur., 2021; Roden i sur., 2019).

Da bi došli do nekih zaključaka o validnosti izmjerenih vrijednosti IL-37 u ovoj skupini ispitanika, usporedili smo dobivene raspone vrijednosti iz drugih studija o pojedinim kardio-metaboličkim stanjima te sa referentnim rasponima za zdrave odrasle osobe.

U pacijenata s dužim trajanjem hipertenzije i značajnom aterosklerotskom bolešću u pozadini, razine IL-37 u serumu dosegle su vrijednosti ne više od 50 pg/mL, što je usporedivo s donjim

dijelom gornje kvartile (Ye J i sur., 2021). U bolesnika s kroničnom bolesti srca, prognostički važne vrijednosti IL-37 u serumu bile su od oko 100 pg/mL na više, dosežući maksimum od oko 170 pg/mL (Shou i sur., 2017). Ove su vrijednosti također unutar raspona gornje kvartile. S druge strane, u stanjima kao što su akutni koronarni sindrom, razine IL-37 u serumu bile su niže nego u kontrolnoj skupini i uglavnom su bile ispod 40 pg/mL, što je u rasponu ispod gornje kvartile u ovome istraživanju (Liu C i sur., 2021). Kao zajednički zaključak ovih usporedbi nameće se taj da se pacijenti s povećanim rizikom za negativne ishode mogu generirati iz obje, i donje i gornje kvartile IL-37 (Q2-Q4). Iz svega rečenog proizlazi da bi validacija serumske razine IL-37 temeljena na riziku, a neophodna za rutinsku kliničku upotrebu, trebala uključivati prospektivnu procjenu i potpunije informacije o profilu rizika pacijenta. Zanimljivo zapaženje je da su vrijednosti cirkulirajućih razina IL-37 koje su navedene u ovim patološkim stanjima, te vrijednosti Q3 i djelomično Q4, u ovom istraživanju, bile usporedive s referentnim vrijednostima raspona za zdrave odrasle kontrolne osobe, kako je objavljeno u nedavnoj meta-analizi (Santarelli i sur., 2021). Iz toga proizlaze dva zaključka. Prvi je da su stariji pacijenti s T2D vrlo heterogeni u pogledu vrijednosti IL-37 u cirkulaciji, a drugi zaključak je da postoji potreba za standardizacijom kriterija za kontrolne skupine u kliničkim ispitivanjima, posebno kada je uključeno imunološko testiranje (Siderowf, 2004). Boljem razumijevanju ovih varijacija svakako bi pridonijela i standardizacija laboratorijskih metoda mjerenja IL-37.

Imajući na umu ove činjenice, lakše je razumjeti rezultate ove studije. Tako je analiza razlika istaknula markere metaboličkih poremećaja i kronične upale, zajedno s komorbiditetima KVB, kao čimbenike koji značajno variraju među kategorijama serumskih razina IL-37. To je u skladu s očekivanjima, kada se razmatra uloga IL-37 u smanjenju metaboličkih poremećaja izazvanih kroničnom upalom, kao i činjenica da postoji uska povezanost između T2D i KVB (Cavalli i sur., 2021; Nwaneri i sur., 2013). Regresijski modeli razjasnili su kako određeni čimbenici mogu utjecati na serumske razine IL-37. Ovi rezultati istaknuli su ključnu ulogu stanja krhkosti u tome hoće li IL-37, kao homeostatski mehanizam tkiva i kompenzacijski mehanizam vezan uz upalu, biti pojačano reguliran ili ne. Pokazalo se da stanje krhkosti ima modificirajući učinak na povezanost svih drugih čimbenika sa serumskim razinama IL-37. Povezano s time, nedavno je objavljena studija u kojoj je nađeno da je serumska koncentracija IL-37 značajno manja u zdravih osoba starije dobi, nego u onih srednje i mlađe dobi, što ukazuje da se sa starenjem smanjuje homeostatski odgovor tijela na upalne podražaje (Brunt i sur., 2022). Prema ovim rezultatima, u

okruženju povezanim s poremećajem metabolizma i povećanim stupnjem upale, kao što su dijabetički bolesnici starije dobi, razvoj krhkosti bi mogao biti onaj čimbenik koji ubrzava starenje te se u ovim rezultatima (regresijski modeli) pokazao kao važniji negativni regulator IL-37 nego starija dob kao takva (Amblàs-Novellas i sur., 2021). Na usku povezanost T2D i krhkosti ukazuje i podatak da je prevalencija krhkosti 3-5 puta veća među bolesnicima s T2D nego u općoj populaciji (Yoon i sur., 2019).

Kao što sugeriraju regresijski modeli A i B, prisutnost pred-krhkosti/krhkosti, MS-a (čije je obilježje abdominalna pretilost, kao što je naznačeno varijablom obujam struka) te pothranjenosti (predstavljena varijablom "eritrociti"), poremećaji su za koje je poznato da se preklapaju i prema ovim rezultatima u negativnoj su korelaciji s IL-37 (Ekram i sur., 2021 i Faxén-Irving i sur., 2021). Praktična važnost ovih rezultata mogla bi biti u tome da krhkost, ako je prisutna kod pojedinaca s metaboličkim sindromom, može negativno modulirati utjecaj MS-a (i s njim povezanih metaboličkih poremećaja) na proizvodnju IL-37.

Inače, ako sarkopenija (varijabla „srednji obujam nadlaktice“) i krhkost – dva blisko povezana poremećaja, nisu razvijeni do određene mjere, to može dopustiti kompenzacijskim mehanizmima, tj. povećanjem proizvodnje IL-37, da odgovore na upalne podražaje (predstavljene u regresijskim modelima varijablama "CRP" i "neutrofili %"). O tome da bi IL-37 mogao biti dio složene regulatorne mreže koja također uključuje i sustavnu razinu regulacije, putem aktivacije osovine hipotalamus-hipofiza-štitnjača, objašnjeno je i u radu koji su objavili Majnarić i sur., a što također sugeriraju ovi rezultati (model C) (Majnarić i sur., 2022). Različite definicije sarkopenije vjerojatno nude i različiti uvid u pojedine aspekte ovih procesa.

Da je u dijabetičkih bolesnika starije dobi MS (abdominalni tip pretilosti) jače povezan s krhkosti te da više utječe na regulaciju IL-37 nego opća pretilost (predstavljena s BMI), ukazali su rezultati ove studije (u regresijske modele je selekcionirana varijabla „obujam struka“ ali ne i varijabla BMI) i studije koja je pokazala da krhkost postoji samo u onih pretilih osoba starije dobi koje imaju i MS (Afonso i sur., 2021). U ovoj studiji, u koju su bile uključene osobe starije dobi s T2D i uglavnom s povećanom tjelesnom masom, oko tri četvrtine muškaraca i najveći dio žena su imali i obilježja MS-a. Nešto manje od polovine njih je imalo obilježje pred-krhkosti/krhkosti.

Da bi povezanost između MS-a i krhkosti, barem što se tiče osoba starije dobi s T2D, mogla biti preko njihove povezanosti s KVB-ima i drugim komorbiditetima, ukazuju podatci o tome da se

MS pokazao stabilnim rizičnim čimbenikom KV i općeg mortaliteta kroz sve kategorije BMI pa čak i u osoba koje su klasificirane kao pothranjene (de Hollander i sur., 2012 i Mulligan i sur., 2019). Prisustvo MS-a bez pretilosti, čest je nalaz kod uznapredovale kronične bubrežne bolesti (Ciardullo i sur. 2021). Također je poznato da postoji uska povezanost između T2D i KVB te između KVB i krhkosti (Nwaneri i sur., 2013; Kleipool i sur., 2018).

Pri tome, KVB se mogu pojaviti već u ranim fazama T2D, kada su obično povezane s pretilosti, ali češće nakon duljeg trajanja T2D, što se posebno odnosi na aterosklerotične KVB, kada su često praćene i smanjenom bubrežnom funkcijom te prisutnošću većeg broja drugih, ne-KV komorbiditeta, od kojih su posebno značajne mišićno-koštane i gastro-intestinalne bolesti, što sve skupa pridonosi ubrzanom gubitku mišićnog tkiva i tjelesne mase i razvoju jačih stupnjeva krhkosti (Wu J i sur., 2021; Wu PY i sur., 2019; Tembo i sur., 2021; Li C i sur. 2022). Ističući varijable koje ukazuju na MS, pred-krhkost/krhkost, KAB te ne-KV komorbiditete, regresijski modeli podupiru ove opisane povezane poremećaje.

Da je priča složenija nego što se moglo misliti, sugeriraju rezultati regresijskih modela koji se tiču faktora komorbiditeta (modeli D-F) i Slika 15-19, koji daju dodatna objašnjenja za te rezultate. Ranije studije su naglasile blisku povezanost između KVB i kronične bubrežne bolesti s krhkošću (Kleipool i sur., 2018; Nixon i sur., 2018). Budući da T2D, KVB i kronična bubrežna bolest (dijabetička nefropatija) dugoročno vode prema razvoju sindroma krhkosti, smatra se da se u njihovoj patogenezi pojačava i razina upale (Roden i sur., 2018; Donate-Correa i sur., 2021; Wu i sur., 2021; Pothier i sur., 2022). Kada se razmatraju u ovom kontekstu, rezultati regresijskih modela ukazuju na negativne korelacije krhkosti s višim kvartilima IL-37, dok pozitivna korelacija KAB (model D) i nedostatak povezanosti markera pada bubrežne funkcije (eGFR) s IL-37 se ne čine u skladu jedna s drugom. Kao potvrdu ovih rezultata, (Slika 16 a i b) pokazuju da se učestalost kardiovaskularnih bolesti, uključujući KAB i KSB, povećava prema kvartilima IL-37, dok stadiji opadanja bubrežne funkcije ne pokazuju razlike prema serumskim razinama IL-37 (Slika 15). Ove nedosljednosti u rezultatima regresijskih modela mogu se objasniti novijim spoznajama o sindromu krhkosti, jer noviji dokazi ukazuju da krhkost nije jedinstveno stanje te da su moguća najmanje dva različita entiteta. Važno je razlikovati krhkost kao terminalni stadij iscrpljenosti homeostatskih rezervi uzrokovanih starenjem i kroničnim bolestima (izraženo gubitkom težine ili kaheksijom) i krhkost povezanu s pretilošću (miosteatoza), koja se može

pojavit će u ranim fazama razvoja kardio-metaboličke bolesti i obično je manjeg intenziteta (pred-krhkost) (Periyakoil, 2013; Afonso i sur., 2021). Opažena dihotomija naglašena je i razlikom u povezanosti pred-krhkosti i krhkosti s nižim odnosno višim kvartilima IL-37 (Q2 naspram Q4).

Potreba za razlikovanjem fenotipova dijabetičara s obzirom na razlike u podražajima koji mogu potaknuti proizvodnju IL-37 proizlazi i iz dokaza koji pokazuju da se KVB mogu pojaviti u ranim fazama razvoja T2D, tj. kada je funkcija bubrega održana, te nakon nakon dužeg trajanja bolesti T2D, kada dolazi do pada bubrežne funkcije (Wu i sur., 2021; Cosentino i sur., 2020). Potpora ovom dokazu u ovoj studiji prikazana je na slici 18 (lijevo) koja pokazuje da su dijabetički bolesnici s KVB jednako raspoređeni između onih s očuvanom i onih sa smanjenom funkcijom bubrega. Budući da je KAB u regresijskim modelima prikazana kao čimbenik neovisno povezan s višim razinama IL-37, ta je činjenica mogla uzrokovati ujednačenost (a ne razlike) razina IL-37 prema stupnjevima smanjenja bubrežne funkcije. Osobito ako se uzme u obzir da se novija skupina antidijabetika s renoprotektivnim učinkom više propisuje u bolesnika sa smanjenom bubrežnom funkcijom s ciljem održavanja preostale funkcije (Slika 18, desno) (Giugliano i sur., 2022). Rezultati regresijskih modela također podupiru ovo objašnjenje. U modelima (modeli D i G), KVB (prikazane varijablom "KAB") i noviji oralni antidijabetici (prikazani varijablom "DPP4 inh") suprotno su povezani s višim razinama IL-37. Stimulirajući učinak KAB na proizvodnju IL-37 u osoba sa smanjenom bubrežnom funkcijom također je mogao biti neutraliziran jačim izražavanjem krhkosti. S tim u svezi, nedavni dokazi pokazuju da komplikacije kardio-metaboličkih bolesti u osoba sa smanjenom bubrežnom funkcijom najviše doprinose razvoju krhkosti (Wu i sur., 2019). Još jedan čimbenik koji je jako važan, a uključuje specifične karakteristike ispitanika u uzorku. Odnosi se na dio bolesnika sa sniženom bubrežnom funkcijom (stadij 4, eGFR<45 ml/min), a koji imaju izraženu pretilost, posebice u žena (Slika 19). To je u suprotnosti s većinom dokaza koji pokazuju da je obično ne-pretili tip MS-a povezan sa sniženom funkcijom bubrega (Ciardullo i sur., 2021). To govori u prilog da pretilost u odnosu na kaheksiju i krhkost ima povoljan učinak na poboljšanje metaboličkih i upalnih parametara bolesnika sa smanjenom funkcijom bubrega (Donini i sur., 2020). Ovaj bi učinak mogao biti veći u žena u odnosu na muškarce zbog pristranosti prema spolu prema vrijednostima BMI, a što je osobito vidljivo u bolesnika sa smanjenom bubrežnom funkcijom (Slika 19). Važnost dihotomije između pretilosti u odnosu na ne-pretilost i spolna pristranost u vezi s MS-om, zajedno sa

sniženom bubrežnom funkcijom (eGFR<45 ml/min), kao značajkama ispitanika u ovom uzorku, bit će naglašena i analizom AUC.

Kada se osvrnemo na dobivenu vrijednost IL-17A, rezultati su pokazali da se određene granične vrijednosti IL-17A, temeljene na mjerama osjetljivosti većim od 80%, mogu koristiti za prepoznavanje (iako uključujući i lažno pozitivne slučajeve) dijabetičkih bolesnika u kojih je postignuta optimalna kontrola glukoze u krvi (HbA1C<7%), kao i onih s duljim trajanjem T2D (>10 godina). Oni s bubrežnom bolešću (eGFR<45 ml/min) i oni s BMI<25 kg/m², na temelju PPV većeg od 80%, mogu se točno odabrati prema pragu IL-17A od 1,36 odnosno 1,79. Na temelju mjere specifičnosti veće od 80%, IL-17A se može koristiti za negativnu selekciju (isključivanje), ali s pogreškama (uključujući lažno negativne slučajeve) onih pacijenata s T2D kojima je dijagnosticirana KAB, KSB ili pre-krhkost/ krhkost.

Analiza AUC je pokazala da IL-17A ima samo nisko-umjerenu diskriminatornu sposobnost (AUC<80%) i da ne nadmašuje NLR, koji se koristio kao referentna vrijednost. Istodobno dodavanje drugih, konvencionalnijih upalnih markera u modele povezane s IL-17A nije značajno poboljšalo diskriminirajuću točnost osnovnih modela. Klinički značajni pragovi AUC (>80%) postignuti su određenim klasičnim upalnim markerima ili kombinacijama upalnih markera i to u slučajevima kao što su dijabetički bolesnici sa sniženom bubrežnom funkcijom (eGFR<45 ml/min), oni koji nisu pretili (BMI<25 kg/m²), te žene s T2D koje imaju i MS. Dobru diskriminatornu sposobnost, usporedno bolju od referentnog markera NLR, pokazali su CRP i njegove kombinacije s drugim upalnim markerima, uključujući i IL-17A, a u razlikovanju pacijenata s dijabetesom prema tome imaju li ili ne normalnu tjelesnu masu (BMI<25/≥25 kg/m²). Da male vrijednosti BMI (u rasponu od niskog do normalnog) nisu podudarne sa krhkošću, a što bi se na temelju definicije toga sindroma moglo očekivati, ukazuje rezultat AUC analize. Tako u podskupini ispitanika definiranih kao pred-krhkost/krhkosti, niti jedan upalni marker niti kombinacije markera nisu pokazali klinički značajnu diskriminatornu moć, dok su se u slučaju prepoznavanja ispitanika s malim BMI ti markeri pokazali kao diskriminirajući čimebnici. Nedostatak te podudarnosti može proizlaziti iz činjenice da postoje najmanje dva metabolički različita fenotipa krhkosti u starijih bolesnika s T2D, jedan debeo i drugi normalne (smanjene) tjelesne mase (Abdelhafiz i sur., 2021).

Kada je riječ o utvrđivanju graničnih vrijednosti IL-37, pokazale su se izvedivima u isključivanju (NPV) dijabetičkih bolesnika sa sniženom bubrežnom funkcijom ($eGFR < 45$ ml/min) i KAB te u prepoznavanju, s visokom specifičnošću, onih koji nisu pretili te onih s dijabetičkom retinopatijom. Kao što sugeriraju dokazi te regresijski modeli i ROC analiza u ovoj studiji, veći broj komorbiditeta može djelovati supresivno na indukciju IL-37 kroz učinak na poticanje krhkosti (Vetrano i sur., 2019). Međutim, broj i vrsta komorbiditeta, kao i razlike između ispitanika s obzirom na dob, stupanj razvijenosti stanja krhkosti i vrstu krhkosti te stupanj promjena na ciljnim organima, mogu utjecati na varijacije u stupnju sistemske upale ili pak na stupanj slabljenja homeostatskih mehanizma (u koje spada i IL-37), što se može odražavati u velikoj varijabilnosti cirkulirajućih razina IL-37. Na to ukazuju i ovi rezultati tako što sve vrijednosti IL-37 preko niskog praga od 4,2 pg/ml ukazuju na prisustvo multiplih komorbiditeta.

Od nekardiogenih komorbiditeta, pokazalo se da neki imaju značajniji utjecaj od drugih na regulaciju IL-37, bilo kroz njihovu povezanost s visokom razinom komorbiditeta i razvoj krhkosti, kao što su mišićno-koštani poremećaji (naznačeno s varijabilna “dorzalgiya”) i inkontinencija urina ili kroz povezanost s poremećenim crijevnim mikrobiomom, kao što bi mogao biti slučaj s gastrointestinalnim poremećajima (modeli E i F) (Tembo i sur., 2021; Suskind i sur., 2017; Bekić i sur., 2021).

Najviša dijagnostička granična vrijednost IL-37 je utvrđena za prepoznavanje dijabetičkih bolesnika s malom tjelesnom masom ($BMI < 25$ kg/m²). Ne zna se je li iza tih većih vrijednosti IL-37 stoji jači upalni podražaj ili dobri mehanizmi odgovora na upalne podražaje, budući da, kao i u slučaju IL-17A, nije moguće sa sigurnošću reći radi li se o relativno zdravim osobama s T2D (koje nisu pretile) ili dijabetičkim bolesnicima sa krhosti tipa pothranjenosti.

Zanimljiv je rezultat da bi se TSH u vrijednostima iznad 2,35 mIU/L (još unutar vrijednosti za eutireozu) mogle koristiti za prepoznavanje žena starije dobi s T2D koje imaju i MS. Praktičnu valjanost toga nalaza smanjuje činjenica da su mogući različiti podtipovi i različite kliničke prezentacije MS, a s obzirom na razlike u BMI, stupnju smanjenja bubrežne funkcije, prisutnosti KVB, stupnju upale i slično. To sve ukazuje na potrebu drugačijeg pristupa, koji bi se temeljio na poznavanju zbirnih profila dijabetičkih bolesnika, ako se želi iskoristiti dijagnostički (a i terapijski) potencijal citokina IL-37.

Dosadašnje studije koje su bile usmjerene na procjenu prediktivne vrijednosti klasičnih upalnih markera u kardio-metaboličkim poremećajima, pokazale su da ti markeri nisu učinkoviti prediktori, čak ni kada su u kombinaciji ili s drugim biokemijskim ili molekularnim biomarkerima specifičnim za organ (Kritharides, 2009; Zethelius i sur., 2008). To može biti posljedica toga što je upala u središtu patofiziološke mreže, koja integrira različite putove i okolišne čimbenike (Majnarić i sur., 2015).

Kao što sugeriraju rezultati ove studije, prognostička točnost (AUC) IL-37 za neke podskupine dijabetičkih bolesnika nije učinkovitija od klasičnih upalnih markera, posebice uključujući NLR, koji je korišten kao referentna vrijednost (Tablica 8). Korištenjem klasične ROC metodologije još je veći izazov procijeniti diskriminirajuću vrijednost IL-37 za specifične podskupine tih bolesnika nego što je to slučaj s "pravim" upalnim markerima jer i stimulativni i supresivni čimbenici mogu regulirati njegovu proizvodnju.

Također jedan od ciljeva u izradi ovog doktorskog rada bio je i identificirati obrasce upalnih markera koji su sastavni dio određenih kliničkih konteksta ili fenotipova. Kao temeljni okvir za određivanje tih obrazaca, korištene su informacije o dobi i spolu bolesnika s T2D, o trajanju T2D i hipertenzije te o vremenu početka odnosno vremenu kada je postavljena dijagnoza tih bolesti. Poticaj za takav temeljni okvir bila su saznanja o tome da brzina progresije T2D i razvoja vaskularnih komplikacija, odnosno oštećenja ciljnih organa, ne ovisi samo o trajanju T2D, kako se mislilo ranije, nego i o dobi bolesnika te dobi kada je T2D nastao (Zoungas i sur. 2014).

Faze kronične upale povezane s razvojem oštećenja ciljnih organa, kao osnova progresije kroničnih bolesti starenja, slabo su poznate, velikim dijelom i zbog nedostupnosti proučavanja u živo (Chen i sur. 2018; Medzhitov 2010). Imajući u vidu da se srednje vrijednosti upalnih markera u pojedinim fenotipovima nalaze u ravnoteži s neto učinkom poremećaja koji imaju utjecaja na njihove vrijednosti, bilo je moguće definirati odgovarajuće fenotipove pomoću tehnike klasteriranja (spontanog grupiranja podataka). Klasteri (fenotipovi) su omogućili uvid u faze upalnih odgovora podudarne s točno definiranim kliničkim okruženjima, odražavajući na taj način dinamiku razvoja komorbiditeta povezanih s T2D (Trtica Majnarić i sur., 2019). Identificirani klasteri mogu se koristiti za procjenu rizika i individualiziranu skrb dijabetičkih bolesnika, kao i za planiranje budućih istraživanja.

Iz rezultata dobivenih modelom šest klastera vidljivo je da su varijacije u upalnim markerima koji se već otprije koriste u kliničkoj praksi, kao što su CRP i NLR, bile manje od varijacija u citokinima IL-17A i IL-37, što oprezno opravdava korisnost ovih citokina za rutinsku upotrebu. Posebno se citokin IL-37 pokazao da ima bolju razdjelnu ulogu u odnosu na druge istraživane markere. Međutim, činjenica da se ovaj citokin povećava samo u nekim specifičnim situacijama, ograničava njegovu upotrebu kao samostalnog razdjelnog markera. Isto tako, marker NLR, ako se koristi sam, kao što su raspravili Trtica Majnarić i sur. u svom preglednom radu, teško može razlikovati podskupine žena koje su u dobi oko menopauze ili u ranoj postmenopauzi (dobni raspon 50-65 godina), unatoč tome što se one mogu međusobno razlikovati po profilima KV i metaboličkih poremećaja. Također, taj marker, ako se koristi sam, ne može napraviti razliku između žena te dobi i muškaraca iste dobi (Trtica Majnarić i sur., 2021). Slično je vidljivo i u rezultatima klaster-analize u ovom radu. Konkretno, iako su srednje vrijednosti NLR za klaster bile slične, npr. u klasterima Cl 1/6 i Cl 4/6, karakteristike pacijenata u tim klasterima su pak bile drugačije. Ako se pak u razmatranje upalnog obrasca za pojedini klaster, uz NLR uzme i citokin IL-17A, više vrijednosti ovog citokina u klasteru Cl 1/6 nego u klasteru Cl 4/6 moguće da ukazuju na veći potencijal pacijenata u klasteru Cl 1/6 od onih u klasteru Cl 4/6 za razvoj upale u tkivima. Ukupno gledajući, ovi rezultati su pokazali da je bolje koristiti skup upalnih markera, nego bilo koji pojedinačni, za razlikovanje među fenotipovima bolesnika s T2D.

Jedna od prednosti klaster metode je detaljniji uvid u to kako skup upalnih markera ukazuje na različite faze kronične upale povezane s oštećenjem ciljnih organa T2D. Bolji uvid stekli smo analizom klastera Cl 1/6, Cl 5/6 i Cl 6/6, u modelu sa šest klastera. Zajednička karakteristika ovih klastera je prevlast ženskog spola nad muškim i izostanak KV komorbiditeta. Međutim, razlika postoji u obrascima upalnih markera, što može odražavati razlike u potencijalu osoba u tim klasterima za razvoj oštećenja ciljnih organa i KV komplikacija. U tom smislu, moguće je da su žene u klasteru Cl 1/6 u nepovoljnijem položaju od onih u klasteru Cl 5/6, što se može zaključiti po višim vrijednostima markera NLR i IL-17A, a uz niže vrijednosti citokina IL-37. Ovaj obrazac upalnih markera u bolesnika u klasteru Cl 1/6 bi mogao biti rezultat dugotrajnog trajanja oba glavna čimbenika KV rizika, T2D i hipertenzije, koji su se u bolesnika u tome klasteru pojavile u ranijim godinama života (Slika 21). S tim u vezi, studije su pokazale da je potencijal za razvoj komplikacija u sklopu T2D veći u onih bolesnika kod kojih je T2D nastupio u ranijoj životnoj dobi (Zoungas i sur., 2014).

U boljoj poziciji od ove dvije podskupine dijabetičkih bolesnika, s obzirom na KV prognozu, mogli bi biti ispitanici u podskupini Cl 6/6. To je potkrijepljeno još nižim vrijednostima markera NLR i IL-17A, ali većim vrijednostima citokina IL-37, u ispitanika u tome klasteru, u odnosu na ispitanike u druga dva klastera. Taj bolji upalni profil je u skladu s povoljnijim KV profilom ispitanika (uglavnom žene) u klasteru Cl 6/6, a na što ukazuje nedostatak pretilost i hipertenzije (Slika 21).

Ako, međutim, spojimo dokaze koji pokazuju da serumske koncentracije citokina IL-37 rastu usporedno s razinom inzulinske rezistencije i rezultate dobivene modelom šest klastera, možemo steći dodatni uvid u povezanost između faza kronične upale i progresije oštećenja ciljnih organa u bolesnika s T2D (Li T i sur., 2019; Su i sur. 2021).

S tim u vezi, vidljivo je da se više vrijednosti citokina IL-37 nalaze ne samo kod ispitanika u klasteru Cl 4/6, već i kod onih u klasterima Cl 2/6 i Cl 6/6. Uzimajući u obzir zajedničke značajke ova dva klastera, veće vrijednosti citokina IL-37 mogu se očekivati kod osoba s nedavno dijagnosticiranim T2D i u mlađih od 65 godina, što može biti osnova povećanog potencijala osoba u tim klasterima za razvoj komplikacija, nego kada se T2D pojavi kasnije u životu, nakon 65. godine (kao u klasteru Cl 5/6) (Zoungas i sur., 2014). Gledajući na ovaj način, moguće je da žene u klasteru Cl 6/6 imaju jednak ili čak lošiji KV rizik od žena u klasteru Cl 5/6, usprkos činjenici da obje skupine nemaju kardiovaskularnih komorbiditeta. Samo longitudinalne studije mogu na to dati jasan odgovor.

Svakako treba prokomentirati i dvije podskupine s najstarijim osobama u modelu šest klastera, klastere Cl 3/6 i Cl 4/6, čije su zajedničke značajke bile snižena bubrežna funkcija te višestruki KV i drugi komorbiditeti. Međutim, ovi klasteri izrazito su se međusobno razlikovali u obrascima upalnih markera, što se posebno može vidjeti u bolesnika u klasteru Cl 3/6, gdje su vrijednosti svih upalnih markera uvrštenih u klaster-analizu, uključujući i IL-37, bile na najnižim razinama od svih identificiranih klastera. Značajke pacijenata u ovom klasteru koje bi mogle objasniti takav obrazac upalnih markera mogle bi biti povezane s kasnijom pojavnošću T2D (u dobi od 70 godina) i s prevlasti osoba ženskog spola. S tim u vezi, dokazi sugeriraju da pojava T2D u poodmakloj dobi, nakon 70. ili u 80-tim godinama života, nosi nizak rizik od skore smrtnosti (Zoungas i sur., 2014). Kao što je pokazano na primjeru markera NLR, kapacitet za diseminaciju upalnih stanica kroz tkiva može biti nizak u žena u postmenopauzi (Trtica Majnarić i sur. 2021).

Da niske vrijednosti upalnih markera kod osoba u klasteru Cl 3/6 nisu znak iscrpljenosti homeostatskih mehanizma, kao dokaz za to može biti odsutnost krhkosti.

Za razliku od klastera Cl 3/6, istaknuto obilježje dijabetičkih bolesnika u klasteru Cl 4/6 bila je prisutnost krhkosti. U skladu s ovom značajkom, bila je i veća srednja vrijednost supresivnog upalnog markera IL-37 u bolesnika u ovom klasteru nego u bolesnika u klasteru Cl 3/6, što može biti odraz uznapredovalih faza oštećenja ciljnih organa i razvoja vaskularnih komplikacija, pri čemu se kronični upalni procesi prožimaju s fibroznim procesima (Trtica Majnarić i sur., 2021; Su Z i sur., 2021; Frangiannis, 2020).

To, međutim, ne mora biti loš prognostički znak, uzimajući u obzir dokaze da do porasta IL-37 dolazi u uvjetima s povećanom inzulinskom rezistencijom, koja kod vrlo starih muškaraca (što je značajka osoba u klasteru Cl 3/6), unatoč prisutnosti aterosklerotske bolesti, može biti znak dugovječnosti (Slika 21) (Pes i sur., 2004; Fairweather 2015, Li T i sur., 2019).

Na taj način, rezultati ovog doktorskog rada podržavaju tezu da se na proces starenja treba gledati kao na proces preoblikovanja i adaptacije patofizioloških mehanizama, a ne jednostavno kao na progresivno smanjenje homeostatskih rezervi (Franceschi C i sur., 2000).

Gledano iz perspektive opisa klastera, nameću se još neke dodatne hipoteze. Prva je povezanost IL-37 s MS-om i metaboličkim poremećajima povezanim s MS-om, prije svega s povećanim stupnjem inzulinske rezistencije (otpor ciljnih tkiva na metabolički učinak inzulina), koja i čini patofiziološku osnovu toga sindroma (Huang, 2009). Na tu povezanost je ukazala analiza klastera, kao i model multiple regresijske analize s upalnim markerima kao ishodišnim varijablama (Tablica 18). U tome modelu je tip dislipidemije povezane s metaboličkim sindromom i inzulinskom rezistencijom, predstavljan povišenim trigliceridima i sniženim HDL kolesterolom, pozitivno povezan samo s markerom IL-37, dok su markeri NLR i IL-17A viši u odsutnosti znakova metaboličkog sindroma. To je u skladu s dokazima o ulozi IL-37 u posredovanju u metaboličkim poremećajima povezanim s upalom (Chang YW i sur., 2021). Time se mogu dopuniti gore napisani komentari i proširiti značenje rezultata regresijskih modela kojima se ispitala povezanost brojnih čimbenika s IL-37. Naime, u svjetlu ovih dodatnih rezultata, povezanost MS-a i cirkulirajućih razina IL-37 ne bi bila samo preko uske povezanosti MS-a sa stanjem krhkosti, nego i putem nezavisnog učinka MS-a na IL-37, putem stupnja inzulinske rezistencije – dakle temeljnih patofizioloških procesa na sučelju metaboličkih i upalnih

puteva, u kojima posreduje IL-37 (Rehman i sur., 2016; Cavalli i sur. 2017). U budućnosti bi trebalo provjeriti tu hipotezu, a koju sugeriraju rezultati ovoga istraživanja, tj. da MS djeluje poticajno na IL-37, a u slučaju razvoja krhkosti jačeg stupnja, to prelazi u supresivno djelovanje. I male razlike u cirkulacijskim koncentracijama IL-37 mogle bi pri tome označavati nastale razlike u pojedinim poremećajima. Za to je potrebno testiranje inzulinske rezistencije na subcelularnoj razini primjenom zlatnog standarda, poput fosforilacije IRS-1.

Usko povezana s prethodnom je i hipoteza o važnoj ulozi neuroendokrine osovine hipotalamus-hipofiza-štitnjača (marker je TSH) koja bi skupa s IL-37 sudjelovala u regulaciji metaboličkih poremećaja tipa inzulinske rezistencije i MS-a. Na to ukazuju rezultati regresijskih modela koji opisuju IL-37 (Tablica 9, model C) te rezultati ispitivanja graničnih vrijednosti i ROC analize, kao i multipla regresijska analiza, koja je pokazala jaku negativnu povezanost TSH i ishodišnog markera IL-37. Na temelju te jake negativne povezanosti, može se pretpostaviti postojanje automatizma negativne povratne sprege između cirkulacijskih razina citokina IL-37 i hormona TSH. Shodno tome, odavno je poznata uloga hormona štitnjače u održavanju energijskog metabolizma (McAninch 2017). Prema postojećim dokazima, poznato je da se sa starenjem smanjuje aktivnost štitnjače i osjetljivost osovine hipotalamus-hipofiza-štitnjača, kao i ciljnih tkiva na hormone štitne žljezde (Rakov i sur., 2019).

To se dovodi u vezu s razvojem komorbiditeta i shodno tome, povećanju stupnja upale i oksidacijskog stresa u tkivima (Mancini i sur., 2016). Pri tome se pretpostavlja da povezanost starenja s pretilošću i posebno s pojavom MS-a, na što ukazuju i naši rezultati, predstavlja okvir za ubrzano starenje i razvoj komorbiditeta, kao i opadanje potencijala homeostatskih mehanizama (Franceschi C i sur. 2018). Prema rezultatima ovoga istraživanja, povezanost MS-a i TSH posebno dolazi do izražaja kod starijih žena s T2D i MS, a opis uzorka ispitanika i ukazuje na veću zastupljenost MS-a kod žena nego kod muškaraca u ovoj skupini ispitanika. To bi moglo biti povezano i sa spolnom neravnotežom u sklonosti za pretilost abdominalnog tipa, čemu su osobito sklone starije žene u poslijemenopauzi (Vryonidou i sur., 2015). Oprez je potreban u razlikovanju promjena razine TSH izazvanih starenjem od onih izazvanih sindromom niskog trijodtironina (sick euthyroid sindrom).

6.3. Originalnost istraživanja za potrebe doktorskog rada

Kada je riječ o kroničnim kompleksnim bolestima kao što je T2D, brojni okolišni čimbenici doprinose inter-individualnim varijacijama u izražavanju bolesti, što dodatno daje na složenosti razumijevanja patofiziologije faza kronične upale. Unatoč postojećim znanjima, i dalje ostaje nepoznanica kako se u bolesnika s T2D s prisutnošću drugih komorbiditetnih stanja (karakteristično za stariju dob i tu bolest) iscrpljuju rezerve homeostaze i kako se razvija krhkost. S ciljem toga, nastala je ideja za integriranjem postojećih znanja u izradi ovog doktorskog rada, a uz dostupnost novih metoda za analizu podataka, kako bi se otkrili skriveni fenotipovi oboljelih i u budućnosti bolje pristupilo liječenju kompleksnih pacijenata kao što su pacijenti s T2D (personalizirani pristup u liječenju).

Budući da je T2D uglavnom bolest povezana sa starošću, dodatno se naglašava heterogenost fenotipova povezanih s T2D, povećavajući potencijal za razvoj više komorbiditeta, pothranjenosti, sarkopenije i krhkosti. Osim dobro poznate činjenice da rizik od vaskularnih komplikacija i mortaliteta raste s trajanjem T2D, noviji dokazi ukazuju i na važnost regulacije glikemije, dobi u kojoj je dijagnosticiran T2D, kao i dužine trajanja T2D (Cigolle i sur., 2022). Vođeni ovim činjenicama, nastala je ideja za grupiranjem upalnih markera s varijablama koje ukazuju na sociodemografske i kliničke karakteristike pacijenata s T2D, kako bi se dobio uvid u skrivene fenotipske podtipove koji postoje u pacijenata s dijabetesom na razini primarne zdravstvene zaštite u stvarnom okruženju. Očekivalo se da će predloženi istraživački pristup pomoći liječnicima u primarnoj zdravstvenoj zaštiti u kliničkom prosuđivanju, smanjenjem dijagnostičke nesigurnosti s kojom se svakodnevno suočavaju prilikom obrade i liječenja kompleksnih pacijenata s T2D i drugim kroničnim bolestima povezanim sa starenjem (Bosnic i sur., 2021).

Definiranje fenotipova dijabetičkih bolesnika na način kako je učinjeno u ovom radu, moglo bi ubrzati istraživanje genetskih polimorfizama citokina uključenih u patogenezu T2D i njihovo povezivanje s određenim profilima bolesnika s dijagnozom T2D, što bi omogućilo i brži razvoj odgovarajuće „pacijentu-usmjerene“ biološke terapije.

S obzirom da je jedan od ciljeva u ovom doktorskog radu bio i odrediti granične vrijednosti citokina IL-17A i IL-37, naliza prvog koraka u procjeni kliničke korisnosti nekog novog biomarkera je određivanje njegovih graničnih vrijednosti, koje mogu razlikovati pojedince koji su

u riziku od bolesti (ili negativnog ishoda) od onih koji nisu, te usporediti sposobnost razlikovanja novih markera od već validiranih biomarkera (Perkins i sur., 2006). Za tu svrhu korištena je ROC analiza kao komplementarna metoda koja se koristi za testiranje točnosti diskriminacije određivanjem karakteristika osjetljivosti i specifičnosti testne funkcije (Janket i sur., 2007). Ovo je prva studija u kojoj je analizirana klinička korisnost citokina IL-17A i IL-37, mjenjenih u serumu starijih pacijenata s T2D.

6.4. Ograničenja provedenog istraživanja

Jedno od ograničenja u provedbi ovog istraživanja za potrebe doktorskog rada leži u relativno malom broju sudionika, kako bi se adekvatno omogućilo sudjelovanje pacijenata s T2D u više podskupina. Ipak treba imati na umu da je ovo istraživanje provedeno na lokalnom području u vrijeme pandemije SARS- COV2 kada su vladale stroge epidemiološke mjere sukladno smjernicama nadležnih tijela za vrijeme pandemije, i da su pacijenti pozivani u ordinacije obiteljske medicine. Slijedom navedenog dobiveni rezultati odražavaju i politiku propisivanja recepata i strategije liječenja pacijenata s T2D liječnika s ovog područja.

6.5. Dobiveni rezultati koji se uklapaju u poznato

Rezultati ove studije ukazali su na još jedan modificirajući čimbenik razine IL-17A, a to je krhkost (eng. *Frailty*) – stanje iscrpljenosti homeostaze u više organa i često povezano sa sarkopenijom (gubitkom mišića) (Gingrich i sur., 2019; Pothier i sur., 2022). Poznato je da prevalencija krhkosti raste s dobi i brojem komorbiditeta te da to stanje dodatno pogoršava prognozu i učinak liječenja kod starijih bolesnika s dijagnozom T2D, što zahtijeva prilagodbu ciljeva liječenja (Gingrich i sur., 2019; Strain i sur., 2021). Stariji bolesnici s T2D posebno su skloni razvoju višestrukih komorbiditeta, pothranjenosti, sarkopeniji i krhkosti, što može promijeniti vrijednosti nekih metaboličkih KV čimbenika rizika, a time i razinu upale (Strain i sur., 2021; Bellary i sur., 2021 i sur; Samson i sur., 2022). Iz svega je vidljivo da je razvoj pre-krhkosti i krhkosti kod starijih dijabetičkih bolesnika uvjetovan prisutnošću komorbiditeta i da kumulativno može utjecati na serumsku razinu IL-17A u tih bolesnika, a što sugeriraju i rezultati ove studije. Provedene su još dvije slične studije na starijim osobama regrutiranim iz opće populacije (Babič, i sur., 2019; Bekić i sur., 2021). Uočeno je da su se bolesti mišićno-koštanog

sustava pokazale povezanima sa sindromom krhkosti. Ipak, povezanost između T2D i bolesti mišićno-koštanog sustava s krhkošću je vjerojatno preko očite predispozicije ova dva stanja da potiču razvoj sarkopenije (Tembo i sur., 2021). S druge strane, ko-egzistencija između T2D i osteoporoze može sinergizirati povišenje razine IL-17A u serumu jer je osteoporoza u dijelom potaknuta upalom i bliska je u nekim aspektima autoimunim poremećajima (Zhang J i sur., 2015). Međutim, usprkos ranije utvrđenom stajalištu da je krhkost povezana s povećanom razinom upale, rezultati ove studije to nisu podržale (izostanak značajne razlike u učestalosti krhkosti između kvartila IL-17A te negativne korelacije između stanja krhkosti i IL-17A u regresijskim modelima). Također, neke druge nedavne studije ukazuju na isto, što govori o potrebi ponovnog razmatranja povećane upale kao biomarkera krhkosti (Amblàs-Novellas i sur., 2021). Slijedom navedenog, dovodi se u pitanje odnos između razvoja krhkosti i upale (te time i razine serumskog IL-17A), što se može objasniti ovisnošću o kontekstu i promatranoj dozi-učinku. To sugerira i činjenica da krhkost može biti povezana i s pretilošću, a ne samo sa smanjenjem tjelesne mase te da obrazac komorbiditeta može odrediti stupanj krhkosti, što podupire takvo stajalište (Alberro i sur., 2021; Crow i sur., 2019).

Za ralikom od citokina IL-17A, krhkost ima supresivni učinak na razine IL-37 u cirkulaciji i veliki modificirajući učinak na povezanost metaboličkih i upalnih čimbenika s IL-37, uključujući i učinke na liječenje (Bosnic i sur., 2023).

Da broj komorbiditeta koji prate T2D pridonosi kompleksnosti ove bolesti utječući na patofiziološke putove i heterogenost fenotipova, vidljivo je iz činjenice da se mogu razlikovati najmanje dva tipa fenotipa sarkopenične krhkosti koji se mogu prepoznati u starijih dijabetičkih bolesnika, a uključuju sarkopeničku pretilost i pothranjenu krhkost (Bellary i sur., 2021; Hu i sur., 2016).

Ta dva fenotipa se pak mogu međusobno razlikovati u opsegu povezanih komorbiditeta, sustavnoj razini upale i putovima povezanim s metabolizmom i upalom koji se nalaze u osnovi njihove kliničke ekspresije (Abdelhafiz i sur., 2021). Iz svega je vidljivo da je T2D progresivna bolest, koja pokazuje dinamiku tijekom vremena, tako da se prilikom otkrivanja obično pojavljuje u vezi s pretilošću, dok se u kasnijem tijeku progresije bolesti, a usporedno s nakupljanjem komorbiditeta i razvojem komplikacija, fenotipska ekspresija T2D mijenja i poprima karakteristike slabljenja organizma, smanjenja tjelesne mase, postupnog razvoja

pothranjenosti i uznapređovalog stupnja sindroma krhkosti (Alberro i sur., 2021; Wu i sur., 2021).

6.6. Što se može dalje istražiti?

Odvajanje starijih pacijenata s T2D u diskretne fenotipske podskupine (klasterne), kao što je učinjeno u ovom doktorskom radu, mogao bi biti način za smanjenje kompleksnosti ovih bolesnika i stratifikaciju rizika za negativne ishode te bi se mogao koristiti i kao model za personalizirani pristup liječenju. U prospektivnom praćenju, ti definirani klasteri bi mogli pokazati koji klaster dovodi do kojih ishoda i kojom brzinom. To bi u konačnici bilo važno za bolju i raniju prevenciju mogućih komplikacija. Osim što starenje utječe na heterogenost T2D, novije studije potvrđuju činjenicu da vrijeme nastanka T2D i dob nastanka, uz duljinu trajanja T2D i uspješnost kontrole glikemije, također utječe na kliničke ishode (Cigolle i sur., 2022).

Raspodjela osoba s jedinstvenom dijagnozom T2D u spontano okupljene podskupine, a primjenom kliničkih, sociodemografskih i upalnih obilježja, omogućila bi i povezivanje genskih polimorfizama gena za citokine s postojanjem određenih fenotipova, što bi pridonijelo otkrivanju i razumijevanju specifičnih patogenetskih puteva. Ovaj istraživački pristup posebno bi mogao biti koristan obiteljskim liječnicima koji se svakodnevno u svome radu suočavaju s problemom kompleksnosti ove skupine pacijenata. To je vidljivo u nedavno provedenoj studiji kojom su utvrđena ograničenja u korištenju klasičnih pristupa u određivanju dijagnostičke i prognostičke korisnosti citokina IL-37 u bolesnika s T2D, čime se dodatno postavio temelj za nove metodološke pristupe i veću potrebu za metodama strojnog učenja u kliničkim istraživanjima o T2D (Bosnic i sur., 2023).

Personalizirani pristup u liječenju, temeljen na identifikaciji ovih fenotipova, podrazumijevao bi različite oblike liječenja za bolesnike iz pojedinih podtipova T2D. Tako, primjerice, vrlo stare pacijente s KV komorbiditetima i krhkošću, kao što je prikazano u doktorskom radu u klasteru C1 4/6, usprkos povećanoj inzulinskoj rezistenciji, ne bi trebalo liječiti inzulinskim senzibilizatorima ili uopće s mnogo lijekova, već im osigurati kvalitetnu opću njegu i nutritivnu potporu. Za žene s visokim vrijednostima upalnih markera NLR i IL-17A u kombinaciji s niskim vrijednostima IL-37, kao u klasteru C1 1/6, rješenje bi moglo biti protuupalno liječenje ili terapija temeljena na nadomještanju IL-37. Za žene s umjerenim KV rizikom i upalnim profilom, poput onih u klasteru

Cl 6/6, naprotiv, samo nefarmakološke mjere i mjere koje mijenjaju način života trebale bi biti dovoljne. Konačno, za žene u klasteru Cl 3/6, koje bi mogle imati nizak potencijal za napredovanje KV komorbiditeta i koje pate od afektivnih poremećaja (npr. anksioznost/depresija), preporuke za tjelesnu aktivnost i kognitivno bihevioralnu terapiju mogla bi biti optimalna terapijska opcija.

Zahvaljujući napretku IT tehnologije i molekularne biologije, danas se razvijaju novi pristupi u istraživanju T2D koji su usmjereni na identifikaciju specifičnih metaboličkih puteva i fenotipova koji bi mogli podržati personalizirano liječenje ovih bolesnika i to putem povezivanja podataka iz genomike i osobnih i kliničkih podataka o bolesnicima primjenom „data-driven“ pristupa, odnosno modeliranja podataka (McCarthy, 2017; Ahlqvist i sur., 2018; Wesolowska-Andersen i sur., 2022). Neke od novijih tehnologija, kao što je sekvenciranje DNA ili RNA na razini jedne stanice, zajedno s naprednim kompjuterskim tehnikama za obradu podataka, pokazuju do sada neslućene mogućnosti pružanja uvida u povezanost patologije na razini pojedinih tkiva i organa s kliničkom ekspresijom bolesti (Wu M i sur., 2021). Odvajanje starijih pacijenata s T2D u diskretne fenotipske podskupine (klustere), kao što je učinjeno u ovom doktorskom radu, mogao bi biti način za smanjenje kompleksnosti ovih bolesnika i stratifikaciju rizika za negativne ishode te bi se mogao koristiti i kao model za personalizirani pristup liječenju. U prospektivnom praćenju, ti definirani klasteri bi mogli pokazati koji klaster dovodi do kojih ishoda i kojom brzinom. To bi u konačnici bilo važno za bolju i raniju prevenciju mogućih komplikacija. Raspodjela osoba s jedinstvenom dijagnozom T2D u spontano okupljene podskupine, a primjenom kliničkih, sociodemografskih i upalnih obilježja, omogućila bi i povezivanje genskih polimorfizama gena za citokine s postojanjem određenih fenotipova, što bi pridonijelo otkrivanju i razumijevanju specifičnih patogenetskih puteva. Ovaj istraživački pristup posebno bi mogao biti koristan obiteljskim liječnicima koji se svakodnevno u svome radu suočavaju s problemom kompleksnosti ove skupine pacijenata.

7. ZAKLJUČCI

1. Ambulantni pacijenti u općoj/obiteljskoj medicini, stariji od 50 godina ili više, oboljeli od T2D pokazuju sklonost multimorbiditetu i razvoju metaboličkog sindroma, KV komorbiditeta (KAB, KBS) i nekardiovaskularnih komorbiditeta (mišićno-koštane bolesti i anksiozni poremećaji) te stanja krhkosti.

2. U većine ispitanika usko je područje vrijednosti citokina IL-17A, što ukazuje na njegovu nisku varijabilnost (IQR 0,21 – 3,21; granične vrijednosti 1,42 (između prve i druge kvartile), 1,71 (između druge i treće kvartile), odnosno 2,92 (između treće i četvrte kvartile))

3. Vrijednosti IL-37 su pokazale veliku varijabilnost, krećući se od jedva mjerljivih (0,14 pg/mL) do 258,80 pg/mL (uz izuzetak jedne ekstremne vrijednosti od 1788,4 pg/mL). Ipak, za većinu ispitanika, vrijednosti IL-37 su oscilirale između 3,40 i 38,0 pg/mL, a bile su iskrivljene oko srednje vrijednosti od 13,40 pg/mL (između 1. i 2. kvartile iznosile su 3,40, između 2. i 3. kvartile 13,40, a između 3. i 4. kvartile 38,00)

4. Vrijednosti IL-37 rastu linearno prema vrijednostima kvartila IL-17A, dok vrijednosti IL-17A blaže rastu prema kvartilima IL-37. Citokini IL-17A i IL-37 bili su pozitivno povezani jedan s drugim, s tim da su vrijednosti IL-37 bile puno više ovisne o stupnjevima porasta citokina IL-17A u usporedbi s citokinom IL-17A, čije su vrijednosti bile manje ovisne o stupnjevima porasta citokina IL-37.

5. Čimbenici koje su se pokazali značajno povezani s varijacijama u vrijednostima IL-17A bili su oni koje ukazuju na upalu, poremećaj lipida i neka komorbiditetna stanja, uključujući osteoporozu, osteoartritis i urogenitalne bolesti. Prilikom procjene povezanosti čimbenika pokazatelja upale s razinama IL-17A potrebno je uzeti u obzir spol i dob. Prilikom procjene povezanosti komorbiditetnih stanja u obzir treba uzeti i status krhkosti. Status krhkosti može modificirati učinak nekih antidijabetičkih lijekova na IL-17A.

6. Prisutnost KVB (KAB) i MS je pozitivno povezano s cirkulirajućim razinama IL-37, dok stanje krhkosti smanjuje taj utjecaj, kao i utjecaj povećane upale na IL-37. Neki lijekovi su negativno povezani s cirkulirajućim razinama IL-37 i stanje pred-krhkosti/krhkosti modificira njihov učinak na IL-37.

7. Dobru diskriminatornu sposobnost citokin IL-17A je pokazao u razlikovanju bolesnika s T2D prema tome imaju li ili ne normalnu tjelesnu masu ($BMI < 25 / \geq 25$ kg/m²). Za istu, ne-pretilu podskupinu bolesnika, u smislu njenog prepoznavanja, je i IL-37 pokazao najbolju diskriminirajuću sposobnost. Kliničku primjenu toga nalaza ipak ograničava činjenica da za ne-pretile bolesnika s dijabetesom tipa 2 nije moguće sa sigurnošću reći radi li se o relativno zdravim osobama s T2D (koje nisu pretile) ili dijabetičkim bolesnicima sa krhkosti tipa pothranjenosti.

8. Bolesnici s dijagnozom T2D, posebno oni starije dobi, ne mogu se uniformno gledati, zbog velikih međusobnih razlika s obzirom na antropometrijske mjere, komorbiditetna stanja, metaboličke parametre, stupanj upale te razvijenost stanja krhkosti. Da bi se moglo zaključivati o dijagnostičkoj vrijednosti rutinskog mjerenja koncentracije u krvi citokina IL-17A i IL-37, potrebno je definirati podskupine (fenotipove) bolesnika s T2D, a na temelju spontanog okupljanja u podskupine parametara koji opisuju obilježja tih bolesnika. To je moguće zahvaljujući dostupnosti novih metoda za obradu većeg broja podataka, kao što je metoda klasteriranja.

9. Skup upalnih markera pokazao se kao bolji nego bilo koji pojedinačni, za razlikovanje među fenotipovima bolesnika s T2D.

8. LITERATURA

Abdelhafiz AH, Brown SH, Bello A, El Nahas M. Chronic kidney disease in older people: physiology, pathology or both?. *Nephron Clin Pract.* 2010, 116, c19-c24.

Abdelhafiz AH, Emmerton D, Sinclair AJ. Impact of frailty metabolic phenotypes on the management of older people with type 2 diabetes mellitus. *Geriatr Gerontol Int.* 2021;21(8):614-622.

Afonso C, Sousa-Santos AR, Santos A, Borges N, Padrão P, Moreira P, Amaral TF. Frailty status is related to general and abdominal obesity in older adults. *Nutr Res.* 2021;85:21-30.

Ahlqvist E, Storm P, Käräjämäki A, Martinell M, Dorkhan M, Carlsson A, Vikman P, Prasad RB, Aly DM, Almgren P, Wessman Y, Shaat N, Spégel P, Mulder H, Lindholm E, Melander O, Hansson O, Malmqvist U, Lernmark Å, Lahti K, Forsén T, Tuomi T, Rosengren AH, Groop L. Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018, 6, 361-369.

Alberro A, Iribarren-Lopez A, Sáenz-Cuesta M, Matheu A, Vergara I, Otaegui D. Inflammaging markers characteristic of advanced age show similar levels with frailty and dependency. *Sci Rep.* 2021;11(1):4358.

Amblàs-Novellas J, Murray SA, Oller R, Torné A, Martori JC, Moine S, Latorre-Vallbona N, Espauella J, Santaegúenia SJ, Gómez-Batiste X. Frailty degree and illness trajectories in older people towards the end-of-life: a prospective observational study. *BMJ Open.* 2021;11(4):e042645.

American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2022 Abridged for Primary Care Providers. *Clin Diabetes.* 2022, 40, 10-38.

Angkananard T, Anothaisintawee T, McEvoy M, Attia J, Thakkinstian A. Neutrophil Lymphocyte Ratio and Cardiovascular Disease Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2018, 2018, 2703518.

Araos P, Figueroa S, Amador CA. The Role of Neutrophils in Hypertension. *Int J Mol Sci.* 2020, 21, 8536.

Arts RJ, Joosten LA, Netea MG. Immunometabolic circuits in trained immunity. *Semin Immunol*. 2016, 28, 425-430.

Aso Y, Fukushima M, Sagara M, Jojima T, Iijima T, Suzuki K, Momobayashi A, Kasai K, Inukai T. Sitagliptin, a DPP-4 inhibitor, alters the subsets of circulating CD4+ T cells in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2015;110(3):250-256.

Ballak DB, Li S, Cavalli G, Stahl JL, Tengedal IW, van Diepen JA, Klück V, Swartzwelter B, Azam T, Tack CJ, Stienstra R, Mandrup-Poulsen T, Seals DR, Dinarello CA. Interleukin-37 treatment of mice with metabolic syndrome improves insulin sensitivity and reduces pro-inflammatory cytokine production in adipose tissue. *J Biol Chem*. 2018;293(37):14224-14236.

Babič F, Trtica Majnarić L, Bekić S, Holzinger, A. Machine learning for family doctors: A case of cluster analysis for studying aging associated comorbidities and frailty. *International Cross-Domain Conference for Machine Learning and Knowledge Extraction. Lecture Notes in Computer Science, Extraction*. Springer, Cham. 2019, pp. 178-194.

Barbi J, Pardoll D, Pan F. Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunol Rev*. 2013;252(1):52-77.

Barbesino G. Thyroid Function Changes in the Elderly and Their Relationship to Cardiovascular Health: A Mini-Review. *Gerontology*. 2019, 65, 1-8.

Bechara R, McGeachy MJ, Gaffen SL. The metabolism-modulating activity of IL-17 signaling in health and disease. *J Exp Med*. 2021;218(5):e20202191.

Bekić S, Babič F, Pavlišková V, Paralič J, Wittlinger T, Majnarić LT. Clusters of Physical Frailty and Cognitive Impairment and Their Associated Comorbidities in Older Primary Care Patients. *Healthcare (Basel)*. 2021;9(7):891.

Bellary S, Kyrou I, Brown JE, Bailey CJ. Type 2 diabetes mellitus in older adults: clinical considerations and management. *Nat Rev Endocrinol*. 2021;17(9):534-548.

Bennett JM, Reeves G, Billman GE, Sturmberg JP. Inflammation-Nature's Way to Efficiently Respond to All Types of Challenges: Implications for Understanding and Managing "the Epidemic" of Chronic Diseases. *Front Med (Lausanne)*. 2018, 5, 316.

Bekkering S, Joosten LA, van der Meer JW, Netea MG, Riksen NP. Trained innate immunity and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2013, 24, 487-492.

Benigni A, Cassis P, Remuzzi G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med.* 2010, 2, 247-257.

Blagih J, Coulombe F, Vincent EE, Dupuy F, Galicia-Vázquez G, Yurchenko E, Raissi TC, van der Windt GJ, Viollet B, Pearce EL, Pelletier J, Piccirillo CA, Krawczyk CM, Divangahi M, Jones RG. The energy sensor AMPK regulates T cell metabolic adaptation and effector responses in vivo. *Immunity.* 2015;42(1):41-54.

Bohannon RW, Chu J, Stefl M. Association of older women`s limb circumferences and muscle mass as estimated with bioelectrical impedance. *J Phys Ther Sci.* 2016, 28, 1016-19.

Boraschi D, Italiani P, Weil S, Martin MU. The family of the interleukin-1 receptors. *Immunol Rev.* 2018, 281, 197-232.

Bosnic Z, Yildirim P, Babič F, Šahinović I, Wittlinger T, Martinović I, Majnaric LT. Clustering Inflammatory Markers with Sociodemographic and Clinical Characteristics of Patients with Diabetes Type 2 Can Support Family Physicians' Clinical Reasoning by Reducing Patients' Complexity. *Healthcare (Basel).* 2021, 9, 1687.

Bosnić Z, Babič F, Anderková V, Štefanić M, Wittlinger T, Majnarić LT. A Critical Appraisal of the Diagnostic and Prognostic Utility of the Anti-Inflammatory Marker IL-37 in a Clinical Setting: A Case Study of Patients with Diabetes Type 2. *Int J Environ Res Public Health.* 2023;20(4):3695.

Brown CY, Sadlon T, Hope CM, Wong YY, Wong S, Liu N, Withers H, Brown K, Bandara V, Gundsambuu B, Pederson S, Breen J, Robertson SA, Forrest A, Beyer M, Barry SC. Molecular Insights Into Regulatory T-Cell Adaptation to Self, Environment, and Host Tissues: Plasticity or Loss of Function in Autoimmune Disease. *Front Immunol.* 2020, 11, 1269.

Brunt VE, Ikoba AP, Ziembra BP, Ballak DB, Hoischen A, Dinarello CA, Ehringer MA, Seals DR. Circulating interleukin-37 declines with aging in healthy humans: relations to healthspan indicators and IL37 gene SNPs [published online ahead of print, 2022 May 27]. *Geroscience.* 2022;1-20.

Bupp, MRG. Sex, the aging immune system, and chronic disease. *Cell. Immunol.* 2015, 294, 102–110.

Buse JB, Wexler DJ, Tsapas A, Rossing P, Mingrone G, Mathieu C, D'Alessio DA, Davies MJ. 2019 Update to: Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care.* 2020 Feb;43(2):487-493.

Cavalli G, Tengesdal IW, Gresnigt M, Nemkov T, Arts RJW, Domínguez-Andrés J, Molteni R, Stefanoni D, Cantoni E, Cassina L, Giugliano S, Schraa K, Mills TS, Pietras EM, Eisenmüsser EZ, Dagna L, Boletta A, D'Alessandro A, Joosten LAB, Netea MG, Dinarello CA. The anti-inflammatory cytokine interleukin-37 is an inhibitor of trained immunity. *Cell Rep.* 2021;35(1):108955.

Chang YC, Hee SW, Chuang LM. T helper 17 cells: A new actor on the stage of type 2 diabetes and aging?. *J Diabetes Investig.* 2021, 12, 909-913.

Chang YW, Hung LC, Chen YC, Wang WH, Lin CY, Tzeng HH, Suen JL, Chen YH. Insulin Reduces Inflammation by Regulating the Activation of the NLRP3 Inflammasome. *Front Immunol.* 2021;11:587229.

Chehimi M, Vidal H, Eljaafari A. Pathogenic Role of IL-17-Producing Immune Cells in Obesity, and Related Inflammatory Diseases. *J Clin Med.* 2017;6(7):68.

Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 2017 Dec 14;9(6):7204-7218.

Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, Malanda B. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018;138:271-28.

Ciardullo S, Ballabeni C, Trevisan R, Perseghin G. Metabolic Syndrome, and Not Obesity, Is Associated with Chronic Kidney Disease. *Am J Nephrol.* 2021;52(8):666-672.

Cigolle CT, Blaum CS, Lyu C, Ha J, Kabeto M, Zhong J. Associations of Age at Diagnosis and Duration of Diabetes With Morbidity and Mortality Among Older Adults. *JAMA Netw Open.* 2022;5(9):e2232766.

Connelly PJ, Azizi Z, Alipour P, Delles C, Pilote L, Raparelli V. The Importance of Gender to Understand Sex Differences in Cardiovascular Disease. *Can J Cardiol.* 2021;37(5):699-710.

Corrao S, Argano C, Natoli G, Nobili A, Corazza GR, Mannucci PM, Perticone F; REPOSI Investigators. Sex-Differences in the Pattern of Comorbidities, Functional Independence, and Mortality in Elderly Inpatients: Evidence from the RePoSI Register. *J Clin Med.* 2019;8(1):81

Corriere T, Di Marca S, Cataudella E, Pulvirenti A, Alaimo S, Stancanelli B, Malatino L. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio is a strong predictor of atherosclerotic carotid plaques in older adults. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2018;28(1):23-27.

Cortvrindt C, Speeckaert R, Moerman A, Delanghe JR, Speeckaert MM. The role of interleukin-17A in the pathogenesis of kidney diseases. *Pathology.* 2017, 49, 247-258.

Cosentino F, Grant PJ, Aboyans V, Bailey CJ, Ceriello A, Delgado V, Federici M, Filippatos G, Grobbee DE, Hansen TB, Huikuri HV, Johansson I, Jüni P, Lettino M, Marx N, Mellbin LG, Östgren CJ, Rocca B, Roffi M, Sattar N, Seferović PM, Sousa-Uva M, Valensi P, Wheeler DC, ESC Scientific Document Group. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD [published correction appears in *Eur Heart J.* 2020 Dec 1;41(45):4317]. *Eur Heart J.* 2020;41(2):255-323.

Crow RS, Lohman MC, Titus AJ, Cook SB, Bruce ML, Mackenzie TA, Bartels SJ, Batsis JA. Association of Obesity and Frailty in Older Adults: NHANES 1999-2004. *J Nutr Health Aging.* 2019;23(2):138-144.

Cuschieri S. The genetic side of type 2 diabetes - A review. *Diabetes Metab Syndr.* 2019, 13, 2503-2506.

de Hollander EL, Bemelmans WJ, Boshuizen HC, Friedrich N, Wallaschofski H, Guallar-Castillón P, Walter S, Zillikens MC, Rosengren A, Lissner L, Bassett JK, Giles GG, Orsini N, Heim N, Visser M, de Groot LC; WC elderly collaborators. The association between waist circumference and risk of mortality considering body mass index in 65- to 74-year-olds: a meta-analysis of 29 cohorts involving more than 58 000 elderly persons. *Int J Epidemiol.* 2012;41(3):805-817.

den Haan JM, Arens R, van Zelm MC. The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunol Lett.* 2014, 162, 103-112.

Dinarello CA, Nold-Petry C, Nold M, Fujita M, Li S, Kim S, Bufler P. Suppression of innate inflammation and immunity by interleukin-37. *Eur J Immunol.* 2016, 46, 1067-1081.

Dinarello CA. Introduction to the interleukin-1 family of cytokines and receptors: Drivers of innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018;281(1):5-7.

Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018;281(1):8-27.

Donate-Correa J, Ferri CM, Sánchez-Quintana F, Pérez-Castro A, González-Luis A, Martín-Núñez E, Mora-Fernández C, Navarro-González JF. Inflammatory Cytokines in Diabetic Kidney Disease: Pathophysiologic and Therapeutic Implications. *Front Med (Lausanne).* 2021;7:628289.

Donini LM, Pinto A, Giusti AM, Lenzi A, Poggiogalle E. Obesity or BMI Paradox? Beneath the Tip of the Iceberg. *Front Nutr.* 2020;7:53.

Ekram ARMS, Espinoza S, Ernst M, Beilin L, Stocks NP, Ryan J, Woods R. The Association Between Metabolic Syndrome and Frailty in Healthy Community-Dwelling Older Adults, *Innovation in Aging.* 2021, 5, 1, 531–532.

Eurostat Statistics Explained. Health in the European Union—facts and figures. Dostupno na: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Health_in_the_European_Union_%E2%80%93_facts_and_figures.
Pristupljeno 11.07.2022.

Fairweather D. Sex differences in inflammation during atherosclerosis. *Clin Med Insights Cardiol.* 2015;8(Suppl 3):49-59.

Faxén-Irving G, Luiking Y, Grönstedt H, Franzén E, Seiger Å, Vikström S, Wimo A, Boström AM, Cederholm T. Do Malnutrition, Sarcopenia and Frailty Overlap in Nursing-Home Residents?. *J Frailty Aging.* 2021;10(1):17-21.

Fest J, Ruiter R, Ikram MA, Voortman T, van Eijck CHJ, Stricker BH. Reference values for white blood-cell-based inflammatory markers in the Rotterdam Study: a population-based prospective cohort study. *Sci Rep*. 2018;8(1):10566.

Findeisen M, Allen TL, Henstridge DC, Kammoun H, Brandon AE, Baggio LL, Watt KI, Pal M, Cron L, Estevez E, Yang C, Kowalski GM, O'Reilly L, Egan C, Sun E, Thai LM, Krippner G, Adams TE, Lee RS, Grötzing J, Garbers C, Risis S, Kraakman MJ, Mellet NA, Sligar J, Kimber ET, Young RL, Cowley MA, Bruce CR, Meikle PJ, Baldock PA, Gregorevic P, Biden TJ, Cooney GJ, Keating DJ, Drucker DJ, Rose-John S, Febbraio MA. Treatment of type 2 diabetes with the designer cytokine IC7Fc. *Nature*. 2019;574(7776):63-68.

Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*. 2020, 180, 1044-1066.

Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, Seeman T, Tracy R, Kop WJ, Burke G, McBurnie MA; Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. Frailty in older adults: Evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001, 56, 146-56.

Forman DE, Maurer MS, Boyd C, Brindis R, Salive ME, Horne FM, Bell SP, Fulmer T, Reuben DB, Zieman S, Rich MW. Multimorbidity in Older Adults With Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2018, 71, 2149-2161.

Franceschi C, Valensin S, Bonafè M, Paolisso G, Yashin AI, Monti D, De Benedictis G. The network and the remodeling theories of aging: Historical background and new perspectives. *Exp Gerontol*. 2000, 35, 879–896.

Franceschi C, Garagnani P, Morsiani C, Conte M, Santoro A, Grignolio A, Monti D, Capri M, Salvioli S. The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:61.

Franceschi C, Garagnani P, Parini P, Giuliani C, Santoro A. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(10):576-590

Frangogiannis N. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *J Exp Med*. 2020, 217, e20190103.

Germolec DR, Shipkowski KA, Frawley RP, Evans E. Markers of Inflammation. *Methods Mol Biol.* 2018;1803:57-79.

Gingrich A, Volkert D, Kiesswetter E, Thomanek M, Bach S, Sieber CC, Zopf Y. Prevalence and overlap of sarcopenia, frailty, cachexia and malnutrition in older medical inpatients. *BMC Geriatr.* 2019;19(1):120.

Giugliano D, Longo M, Signoriello S, Maiorino MI, Solerte B, Chiodini P, Esposito K. The effect of DPP-4 inhibitors, GLP-1 receptor agonists and SGLT-2 inhibitors on cardiorenal outcomes: a network meta-analysis of 23 CVOTs. *Cardiovasc Diabetol.* 2022;21(1):42.

Global Burden of Metabolic Risk Factors for Chronic Diseases Collaboration. Cardiovascular disease, chronic kidney disease, and diabetes mortality burden of cardiometabolic risk factors from 1980 to 2010: a comparative risk assessment. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014;2(8):634-647.

Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2020, 20, 95-112.

Gubbels Bupp MR. Sex, the aging immune system, and chronic disease. *Cell Immunol.* 2015, 294, 102-110.

Guzmán-Flores JM, Ramírez-Emiliano J, Pérez-Vázquez V, López-Briones S. Th17 and regulatory T cells in patients with different time of progression of type 2 diabetes mellitus. *Cent Eur J Immunol.* 2020;45(1):29-36.

Han C, He X, Xia X, Li Y, Shi X, Shan Z, Teng W. Subclinical Hypothyroidism and Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015, 10, e0135233.

Hickman SP, Turka LA. Homeostatic T cell proliferation as a barrier to T cell tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005, 360, 1713-1721.

Hu JX, Thomas CE, Brunak S. Network biology concepts in complex disease comorbidities. *Nat Rev Genet.* 2016;17(10):615-629.

Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech.* 2009, 2, 231-237.

Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest*. 2006, 116, 1218-1222.

Janket SJ, Shen Y, Meurman JH. Letter by Janket et al regarding article, "Use and misuse of the receiver operating characteristic curve in risk prediction". *Circulation*. 2007;116(6):e133-e134.

Kaiser MJ, Bauer JM, Ramsch C, Uter W, Guigoz Y, Cederholm T, Thomas DR, Anthony P, Charlton KE, Maggio M, Tsai AC, Grathwohl D, Vellas B, Sieber CC; MNA-International Group. Validation of the Mini Nutritional Assessment short-form (MNA-SF): a practical tool for identification of nutritional status. *J Nutr Health Aging*. 2009, 13, 782-788.

Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci*. 2019, 20, 3328.

Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES, Franceschi C, Lithgow GJ, Morimoto RI, Pessin JE, Rando TA, Richardson A, Schadt EE, Wyss-Coray T, Sierra F. Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell*. 2014 Nov 6;159(4):709-13.

Kim YK, Shin JS, Nahm MH. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med J*. 2016, 57, 5-14.

Kleinewietfeld M, Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol*. 2013;25(4):305-312.

Kleipool EE, Hoogendijk EO, Trappenburg MC, Handoko ML, Huisman M, Peters MJ, Muller M. Frailty in Older Adults with Cardiovascular Disease: Cause, Effect or Both? *Aging Dis*. 2018 Jun 1;9(3):489-497.

Klück V, van Deuren RC, Cavalli G, Shaukat A, Arts P, Cleophas MC, Crişan TO, Tausche AK, Riches P, Dalbeth N, Stamp LK, Hindmarsh JH, Jansen TLTA, Janssen M, Steehouwer M, Lelieveld S, van de Vorst M, Gilissen C, Dagna L, Van de Veerdonk FL, Eisenmesser EZ, Kim S, Merriman TR, Hoischen A, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LA. Rare genetic variants in interleukin-37 link this anti-inflammatory cytokine to the pathogenesis and treatment of gout. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(4):536-544.

Kohl TO, Ascoli CA. Indirect Immunometric ELISA. *Cold Spring Harb Protoc*. 2017, 2017, 10.1101/pdb.prot093708.

Kohl TO, Ascoli CA. Immunometric Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2017, 2017, pdb.prot093716.

Kong L, Andrikopoulos S, MacIsaac RJ, Mackay LK, Nikolic-Paterson DJ, Torkamani N, Zafari N, Marin ECS, Ekinci EI. Role of the adaptive immune system in diabetic kidney disease. *J Diabetes Investig.* 2022;13(2):213-226.

Kraja AT, Borecki IB, North K, Tang W, Myers RH, Hopkins PN, Arnett D, Corbett J, Adelman A, Province MA. Longitudinal and age trends of metabolic syndrome and its risk factors: the Family Heart Study. *Nutr Metab (Lond).* 2006, 3, 41.

Kritharides L. Inflammatory markers and outcomes in cardiovascular disease. *PLoS Med.* 2009;6(9):e1000147.

Kroemer G, Zitvogel L. CD4 T Cells at the Center of Inflammaging. *Cell Metabolism.* 2020, 32, 4-5.

Kuo PL, Schrack JA, Shardell MD, Levine M, Moore AZ, An Y, Elango P, Karikkineth A, Tanaka T, de Cabo R, Zukley LM, AlGhatrif M, Chia CW, Simonsick EM, Egan JM, Resnick SM, Ferrucci L. A roadmap to build a phenotypic metric of ageing: insights from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Intern Med.* 2020, 287, 373-94.

Lavoz C, Rayego-Mateos S, Orejudo M, Opazo-Ríos L, Marchant V, Marquez-Exposito L, Tejera-Muñoz A, Navarro-González JF, Droguett A, Ortiz A, Egido J, Mezzano S, Rodrigues-Diez RR, Ruiz-Ortega M. Could IL-17A Be a Novel Therapeutic Target in Diabetic Nephropathy?. *J Clin Med.* 2020;9(1):272.

Lavoz C, Matus YS, Orejudo M, Carpio JD, Droguett A, Egido J, Mezzano S, Ruiz-Ortega M. Interleukin-17A blockade reduces albuminuria and kidney injury in an accelerated model of diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2019, 95, 1418-1432.

Lentsch AB, Ward PA. Regulation of inflammatory vascular damage. *J Pathol.* 2000, 190, 343-348.

Levey AS. A decade after the KDOQI CKD guidelines. *Am J Kidney Dis.* 2012, 60, 683-685.

Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, Kusek JW, Van Lente F; Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate [published correction appears in *Ann Intern Med.* 2008 Oct 7;149(7):519] [published correction appears in *Ann Intern Med.* 2021 Apr;174(4):584]. *Ann Intern Med.* 2006;145(4):247-254.

Ley K, Smith E, Stark MA. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol Res.* 2006, 34, 229-242.

Li C, Li Y, Wang N, Ge Z, Shi Z, Wang J, Ding B, Bi Y, Wang Y, Hong Z. Intestinal Permeability Associated with the Loss of Skeletal Muscle Strength in Middle-Aged and Older Adults in Rural Area of Beijing, China. *Healthcare (Basel).* 2022;10(6):1100.

Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2021, 6, 291.

Li T, Li H, Li W, Chen S, Feng T, Jiao W, Wu C, Dong J, Li Y, Li S, Feng M, Wei X. Interleukin-37 sensitize the elderly type 2 diabetic patients to insulin therapy through suppressing the gut microbiota dysbiosis. *Mol Immunol.* 2019;112:322-329.

Li T, Huang Y, Cai W, Chen X, Men X, Lu T, Wu A, Lu Z. Age-related cerebral small vessel disease and inflammaging. *Cell Death Dis.* 2020, 11, 932.

Litwiniuk A, Bik W, Kalisz M, Baranowska-Bik A. Inflammasome NLRP3 Potentially Links Obesity-Associated Low-Grade

Systemic Inflammation and Insulin Resistance with Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 5603

Liu C, Cui Y, Zhang D, Tian X, Zhang H. Analysis of Serum Interleukin-37 Level and Prognosis in Patients with ACS. *Comput Math Methods Med.* 2021;2021:3755458.

Liu J, Lin J, He S, Wu C, Wang B, Liu J, Duan Y, Liu T, Shan S, Yang K, Dong N, Ji Q, Huang K, Li D. Transgenic Overexpression of IL-37 Protects Against Atherosclerosis and Strengthens Plaque Stability. *Cell Physiol Biochem.* 2018;45(3):1034-1050.

Loftus RM, Finlay DK. Immunometabolism: Cellular Metabolism Turns Immune Regulator. *J Biol Chem.* 2016;291(1):1-10.

López-Bautista F, Posadas-Sánchez R, Vázquez-Vázquez C, Fragoso JM, Rodríguez-Pérez JM, Vargas-Alarcón G. IL-37 Gene and Cholesterol Metabolism: Association of Polymorphisms with the Presence of Hypercholesterolemia and Cardiovascular Risk Factors. The GEA Mexican Study. *Biomolecules.* 2020;10(10):1409.

Lorenzo-López L, Maseda A, de Labra C, Regueiro-Folgueira L, Rodríguez-Villamil JL, Millán-Calenti JC. Nutritional determinants of frailty in older adults: A systematic review. *BMC Geriatr.* 2017,17, 108.

Ip B, Cilfone NA, Belkina AC, et al. Th17 cytokines differentiate obesity from obesity-associated type 2 diabetes and promote TNF α production. *Obesity (Silver Spring).* 2016, 24, 102-112.

Ma J, Li YJ, Chen X, Kwan T, Chadban SJ, Wu H. Interleukin 17A promotes diabetic kidney injury. *Sci Rep.* 2019;9(1):2264.

Ma S, Wang C, Mao X, Hao Y. B Cell Dysfunction Associated With Aging and Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2019, 10, 318.

Majnarić LT, Yildirim P, Holzinger A. Discovery of Characteristics of Patients with Increased Level of Inflammation. *Med chem.* 2015, 5, 512-520.

Majnarić Trtica Lj, Včev A, Tokić S, Jakab J. Imunosne osnove bolesti crijeva. *Osijek. Medicinski fakultet Osijek, Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo;* 2018.

Majnarić LT, Babič F, O'Sullivan S, Holzinger A. AI and Big Data in Healthcare: Towards a More Comprehensive Research Framework for Multimorbidity. *J Clin Med.* 2021;10(4):766

Majnarić LT, Bosnić Z, Guljaš S, Vučić D, Kurevija T, Volarić M, Martinović I, Wittlinger T. Low Psychological Resilience in Older Individuals: An Association with Increased Inflammation, Oxidative Stress and the Presence of Chronic Medical Conditions. *Int J Mol Sci.* 2021, 22, 8970.

Majnarić LT, Bosnić Z, Štefanić M, Wittlinger T. Cross-Talk between the Cytokine IL-37 and Thyroid Hormones in Modulating Chronic Inflammation Associated with Target Organ Damage in Age-Related Metabolic and Vascular Conditions. *Int J Mol Sci.* 2022;23(12):6456.

McAninch EA, Bianco AC. Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1311:77-87.

McCarthy MI. Painting a new picture of personalised medicine for diabetes [published correction appears in *Diabetologia.* 2017 May;60(5):940]. *Diabetologia.* 2017;60(5):793-799.

McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity.* 2019, 50, 892-906.

MDRD for Adults (Conventional Units). Dostupno na: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/professionals/clinical-tools-patient%20management/kidney-disease/laboratory-evaluation/glomerular-filtration-rate%20calculators/mdrd-adults-conventional-un>. Datum pristupa: 15. 04. 2021.

Medzhitov, R. Inflammation 2010: New adventures of an old flame. *Cell* 2010, 140, 771–776.

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008, 454, 428-435.

Medzhitov R. The spectrum of inflammatory responses. *Science.* 2021, 374, 1070-1075.

Meng F, Wang K, Aoyama T, Grivennikov SI, Paik Y, Scholten D, Cong M, Iwaisako K, Liu X, Zhang M, Österreicher CH, Stickel F, Ley K, Brenner DA, Kisseleva T. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology.* 2012;143(3):765-776.e3

Meyers AK, Zhu X. The NLRP3 Inflammasome: Metabolic Regulation and Contribution to Inflammaging. *Cells.* 2020;9(8):1808.

Mountford S, Effenberger M, Noll-Puchta H, Griessmair L, Ringleb A, Haas S, Denk G, Reiter FP, Mayr D, Dinarello CA, Tilg H, Bufler P. Modulation of Liver Inflammation and Fibrosis by Interleukin-37. *Front Immunol.* 2021;12:603649.

Mitchell S, Malanda B, Damasceno A, Eckel RH, Gaita D, Kotseva K, Januzzi JL, Mensah G, Plutzky J, Prystupniuk M, Ryden L, Thierer J, Virani SS, Sperling L. A Roadmap on the Prevention of Cardiovascular Disease Among People Living With Diabetes. *Glob Heart.* 2019;14(3):215-240.

Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* 2009, 22, 240-273.

Molgora M, Barajon I, Mantovani A, Garlanda C. Regulatory Role of IL-1R8 in Immunity and Disease. *Front Immunol.* 2016, 7, 149.

Mortaz E, Alipoor SD, Adcock IM, Mumby S, Koenderman L. Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. *Front Immunol.* 2018, 9, 2171.

Mulligan AA, Lentjes MAH, Luben RN, Wareham NJ, Khaw KT. Changes in waist circumference and risk of all-cause and CVD mortality: results from the European Prospective Investigation into Cancer in Norfolk (EPIC-Norfolk) cohort study. *BMC Cardiovasc Disord.* 2019;19(1):238.

Nashar K, Egan BM. Relationship between chronic kidney disease and metabolic syndrome: current perspectives. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2014;7:421-435.

Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, O'Neill LA, Xavier RJ. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science.* 2016, 352, aaf1098.

Nixon AC, Bampouras TM, Pendleton N, Woywodt A, Mitra S, Dhaygude A. Frailty and chronic kidney disease: current evidence and continuing uncertainties. *Clin Kidney J.* 2018;11(2):236-245.

Nowakowska M, Zghebi SS, Ashcroft DM, Buchan I, Chew-Graham C, Holt T, Mallen C, Van Marwijk H, Peek N, Perera-Salazar R, Reeves D, Rutter MK, Weng SF, Qureshi N, Mamas MA, Kontopantelis E. The comorbidity burden of type 2 diabetes mellitus: patterns, clusters and predictions from a large English primary care cohort [published correction appears in *BMC Med* 2020. *BMC Med.* 2019;17(1):145.

Nwaneri C, Cooper H, Bowen-Jones D. Mortality in type 2 diabetes mellitus: magnitude of the evidence from a systematic review and meta-analysis. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease.* 2013, 13, 192-207.

Pawelec G. Aging as an inflammatory disease and possible reversal strategies. *J Allergy Clin Immunol.* 2020, 145, 1355-6.

Periyakoil VS. Frailty as a terminal illness. *Am Fam Physician*. 2013;88(6):363-368.

Perkins NJ, Schisterman EF. The inconsistency of "optimal" cutpoints obtained using two criteria based on the receiver operating characteristic curve. *Am J Epidemiol*. 2006;163(7):670-675.

Pes GM, Lio D, Carru C, Deiana L, Baggio G, Franceschi C, Ferrucci L, Oliveri F, Scola L, Crivello A, Candore G, Colonna-Romano G, Caruso C. Association between longevity and cytokine gene polymorphisms. A study in Sardinian centenarians. *Aging Clin Exp Res*. 2004 Jun;16(3):244-8.

Pomatto LCD, Davies KJA. The role of declining adaptive homeostasis in ageing. *J Physiol*. 2017;595(24):7275-309.

Porter Starr KN, McDonald SR, Bales CW. Obesity and physical frailty in older adults: a scoping review of lifestyle intervention trials. *J Am Med Dir Assoc*. 2014;15(4):240-250

Pothier K, Gana W, Bailly N, Fougère B. Associations Between Frailty and Inflammation, Physical, and Psycho-Social Health in Older Adults: A Systematic Review. *Front Psychol*. 2022;13:805501.

Powell JD, Pollizzi KN, Heikamp EB, Horton MR. Regulation of immune responses by mTOR. *Annu Rev Immunol*. 2012, 30, 39-68.

Prajapati B, Jena PK, Rajput P, Purandhar K, Seshadri S. Understanding and modulating the Toll like Receptors (TLRs) and NOD like Receptors (NLRs) cross talk in type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2014;10(3):190-200.

Qiu AW, Cao X, Zhang WW, Liu QH. IL-17A is involved in diabetic inflammatory pathogenesis by its receptor IL-17RA. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2021;246(1):57-65.

Rakov H, De Angelis M, Renko K, Hönes GS, Zwanziger D, Moeller LC, Schramm KW, Führer D. Aging Is Associated with Low Thyroid State and Organ-Specific Sensitivity to Thyroxine. *Thyroid*. 2019 Dec;29(12):1723-1733.

Raulet DH. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol*. 2004, 5, 996-1002.

Rea IM, Gibson DS, McGilligan V, McNerlan SE, Alexander HD, Ross OA. Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines. *Front Immunol.* 2018, 9, 586.

Rehman K, Akash MS. Mechanisms of inflammatory responses and development of insulin resistance: how are they interlinked?. *J Biomed Sci.* 2016, 23, 87.

Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation.* 2003;107(3):391-39.

Roden M, Shulman GI. The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature.* 2019;576(7785):51-60.

Rodrigues-Diez RR, Tejera-Muñoz A, Orejudo M, Marquez-Exposito L, Santos L, Rayego-Mateos S, Cantero-Navarro E, Tejedor-Santamaria L, Marchant V, Ortiz A, Egido J, Mezzano S, Selgas R, Navarro-González JF, Valdivielso JM, Lavoz C, Ruiz-Ortega M. Interleukin-17A: Possible mediator and therapeutic target in hypertension. *Interleukina-17A: posible mediador y diana terapéutica en la hipertensión. Nefrologia (Engl Ed).* 2021;41(3):244-257.

Salmond RJ. mTOR Regulation of Glycolytic Metabolism in T Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2018, 6, 122.

Samson LD, H Boots AM, Ferreira JA, J Picavet HS, de Rond LGH, de Zeeuw-Brouwer ML, Monique Verschuren WM, Buisman AM, Engelfriet P. In-depth immune cellular profiling reveals sex-specific associations with frailty. *Immun Ageing.* 2020;17:20.

Samson LD, Buisman AM, Ferreira JA, Picavet HSJ, Verschuren WMM, Boots AM, Engelfriet P. Inflammatory marker trajectories associated with frailty and ageing in a 20-year longitudinal study. *Clin Transl Immunology.* 2022;11(2):e1374.

Santarelli DM, Vincent FB, Rudloff I, Nold-Petry CA, Nold MF, Russo MA. Circulating Interleukin-37 Levels in Healthy Adult Humans - Establishing a Reference Range. *Front Immunol.* 2021;12:708425.

Schüler R, Efentakis P, Wild J, Lagrange J, Garlapati V, Molitor M, Kossmann S, Oelze M, Stamm P, Li H, Schäfer K, Münzel T, Daiber A, Waisman A, Wenzel P, Karbach SH. T Cell-

Derived IL-17A Induces Vascular Dysfunction via Perivascular Fibrosis Formation and Dysregulation of ·NO/cGMP Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:6721531.

Sebastian-Valverde M, Pasinetti GM. The NLRP3 Inflammasome as a Critical Actor in the Inflammaging Process. *Cells.* 2020, 9, 1552.

Shevyrev D, Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front Immunol.* 2020, 10, 3100.

Shou X, Lin J, Xie C, Wang Y, Sun C. Plasma IL-37 Elevated in Patients with Chronic Heart Failure and Predicted Major Adverse Cardiac Events: A 1-Year Follow-Up Study. *Dis Markers.* 2017;2017:9134079.

Sepehri Z, Kiani Z, Afshari M, Kohan F, Dalvand A, Ghavami S. Inflammasomes and type 2 diabetes: An updated systematic review. *Immunol Lett.* 2017, 192, 97-103.

Serhan CN, Levy BD. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *J Clin Invest.* 2018, 128, 2657-2666.

Shou X, Lin J, Xie C, Wang Y, Sun C. Plasma IL-37 Elevated in Patients with Chronic Heart Failure and Predicted Major Adverse Cardiac Events: A 1-Year Follow-Up Study. *Dis Markers.* 2017;2017:9134079.

Siderowf AD. Evidence from clinical trials: can we do better?. *NeuroRx.* 2004;1(3):363-371.

Singh-Manoux A, Fayosse A, Sabia S, Tabak A, Shipley M, Dugravot A, Kivimäki M. Clinical, socioeconomic, and behavioural factors at age 50 years and risk of cardiometabolic multimorbidity and mortality: A cohort study. *PLoS Med.* 2018, 15, 1002571.

Strain WD, Down S, Brown P, Puttanna A, Sinclair A. Diabetes and Frailty: An Expert Consensus Statement on the Management of Older Adults with Type 2 Diabetes. *Diabetes Ther.* 2021;12(5):1227-1247

Su Z, Tao X. Current Understanding of IL-37 in Human Health and Disease. *Front Immunol.* 2021, 12, 696605.

Suskind AM. Frailty and Lower Urinary Tract Symptoms. *Curr Urol Rep.* 2017;18(9):67.

Tembo MC, Mohebbi M, Holloway-Kew KL, Gaston J, Sui SX, Brennan-Olsen SL, Williams LJ, Kotowicz MA, Pasco JA. The contribution of musculoskeletal factors to physical frailty: a cross-sectional study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2021;22(1):921.

Tian Y, Chen T, Wu Y, Yang L, Wang L, Fan X, Zhang W, Feng J, Yu H, Yang Y, Zhou J, Yuan Z, Wu Y. Pioglitazone stabilizes atherosclerotic plaque by regulating the Th17/Treg balance in AMPK-dependent mechanisms. *Cardiovasc Diabetol*. 2017;16(1):140.

Trtica Majnarić L, Martinović I, Šabanović Š, Rudan S, Babič F, Wittlinger T. The Effect of Hypertension Duration and the Age of Onset on CV Risk Factors Expression in Perimenopausal Women. *Int J Hypertens*. 2019;2019:9848125.

Trtica Majnarić L, Guljaš S, Bosnić Z, Šerić V, Wittlinger T. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio as a Cardiovascular Risk Marker May Be Less Efficient in Women Than in Men. *Biomolecules*. 2021, 11, 528.

Uciechowski P, Dempke WCM. Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. *Oncology*. 2020, 98, 131-137.

Vaduganathan M, Ambrosy AP, Greene SJ, Mentz RJ, Subacius HP, Maggioni AP, Swedberg K, Nodari S, Zannad F, Konstam MA, Butler J, Gheorghiade M; EVEREST trial investigators. Predictive value of low relative lymphocyte count in patients hospitalized for heart failure with reduced ejection fraction: insights from the EVEREST trial. *Circ Heart Fail*. 2012, 5, 750-758.

Varela ML, Mogildea M, Moreno I, Lopes A. Acute Inflammation and Metabolism. *Inflammation*. 2018;41(4):1115-1127.

Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin E, Stephens JM, Dixit VD. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med*. 2011, 17, 179-188.

Velikova TV, Kabakchieva PP, Assyov YS, Georgiev TA. Targeting Inflammatory Cytokines to Improve Type 2 Diabetes Control. *Biomed Res Int*. 2021;2021:7297419.

Vetrano DL, Palmer K, Marengoni A, Marzetti E, Lattanzio F, Roller-Wirnsberger R, Lopez Samaniego L, Rodríguez-Mañas L, Bernabei R, Onder G; Joint Action ADVANTAGE WP4

Group. Frailty and Multimorbidity: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2019;74(5):659-666.

Vivier E, Malissen B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat Immunol*. 2005, 6, 17-21.

Volpato S, Guralnik JM, Ferrucci L, Balfour J, Chaves P, Fried LP, Harris TB. Cardiovascular disease, interleukin-6, and risk of mortality in older women: the women's health and aging study. *Circulation*. 2001, 103, 947-953.

Vryonidou A, Paschou SA, Muscogiuri G, Orio F, Goulis DG. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Metabolic syndrome through the female life cycle. *Eur J Endocrinol*. 2015;173(5):R153-R163.

Walker SR, Wagner M, Tangri N. Chronic kidney disease, frailty, and unsuccessful aging: a review. *J Ren Nutr*. 2014;24(6):364-370.

Wang L, Quan Y, Yue Y, Heng X, Che F. Interleukin-37: A crucial cytokine with multiple roles in disease and potentially clinical therapy. *Oncol Lett*. 2018, 15, 4711-471.

Wang P, Wang H, Li C, Zhang X, Xiu X, Teng P, Wang Z. Dysregulation of microRNA-657 influences inflammatory response via targeting interleukin-37 in gestational diabetes mellitus. *J Cell Physiol*. 2019;234(5):7141-7148.

Wang X, Antony V, Wang Y, Wu G, Liang G. Pattern recognition receptor-mediated inflammation in diabetic vascular complications. *Med Res Rev*. 2020;40(6):2466-2484.

Wesolowska-Andersen A, Brorsson CA, Bizzotto R, Mari A, Tura A, Koivula R, Mahajan A, Vinuela A, Tajés JF, Sharma S, Haid M, Prehn C, Artati A, Hong MG, Musholt PB, Kurbasic A, De Masi F, Tsigos K, Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Thomas CE, Banasik K, Jennison C, Jones A, Kennedy G, Bell J, Thomas L, Frost G, Thomsen H, Allin K, Hansen TH, Vestergaard H, Hansen T, Rutters F, Elders P, t'Hart L, Bonnefond A, Canouil M, Brage S, Kokkola T, Heggie A, McEvoy D, Hattersley A, McDonald T, Teare H, Ridderstrale M, Walker M, Forgie I, Giordano GN, Froguel P, Pavo I, Ruetten H, Pedersen O, Dermitzakis E, Franks PW, Schwenk JM, Adamski J, Pearson E, McCarthy MI, Brunak S; IMI DIRECT Consortium. Four groups of

type 2 diabetes contribute to the etiological and clinical heterogeneity in newly diagnosed individuals: An IMI DIRECT study. *Cell Reports Medicine*. 2022, 3, 100477.

Whelton SP, Roy P, Astor BC, Zhang L, Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Coresh J. Elevated high-sensitivity C-reactive protein as a risk marker of the attenuated relationship between serum cholesterol and cardiovascular events at older age. The ARIC Study. *Am J Epidemiol*. 2013;178(7):1076-1084.

Williams A, Peh CA, Elliott T. The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue Antigens*. 2002, 59, 3-17.

Wu B, Wan Y. Molecular control of pathogenic Th17 cells in autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol*. 2020;80:106187.

Wu JD, Liang DL, Xie Y. Prediabetes and risk of heart failure: the link grows stronger. *Cardiovasc Diabetol*. 2021;20(1):112.

Wu M, Lee MYY, Bahl V, Traum D, Schug J, Kusmartseva I, Atkinson MA, Fan G; HPAP Consortium; Kaestner KH. Single-cell analysis of the human pancreas in type 2 diabetes using multi-spectral imaging mass cytometry. *Cell Rep*. 2021;37(5):109919.

Wu PY, Chao CT, Chan DC, Huang JW, Hung KY. Contributors, risk associates, and complications of frailty in patients with chronic kidney disease: a scoping review. *Ther Adv Chronic Dis*. 2019;10:2040622319880382.

Xu WD, Zhao Y, Liu Y. Insights into IL-37, the role in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2015;14(12):1170-1175.

Yan J, Zhang Y, Cheng S, Kang B, Peng J, Zhang X, Yuan M, Chu W, Zhang W, Shen J, Zhang S. Common genetic heterogeneity of human interleukin-37 leads to functional variance. *Cell Mol Immunol*.

Yan X, Xie B, Wu G, Hu J, Wang D, Cai X, Li J. Interleukin-37: The Effect of Anti-Inflammatory Response in Human Coronary Artery Endothelial Cells. *Mediators Inflamm*. 2019, 2019, 2650590.

Ye J, Wang Y, Wang Z, Lin Y, Liu L, Zhou Q, Wang M, Xu Y, Ye D, Zhang J, Wan J, Ji Q. Circulating IL-37 levels are elevated in patients with hypertension. *Exp Ther Med*. 2021;21(6):558.

Yoon SJ, Kim KI. Frailty and Disability in Diabetes. *Ann Geriatr Med Res*. 2019;23(4):165-169.

Yuan S, Zhang S, Zhuang Y, Zhang H, Bai J, Hou Q. Interleukin-17 Stimulates STAT3-Mediated Endothelial Cell Activation for Neutrophil Recruitment. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36(6):2340-2356.

Zadhoush F, Sadeghi M, Pourfarzam M. Biochemical changes in blood of type 2 diabetes with and without metabolic syndrome and their association with metabolic syndrome components. *J Res Med Sci*. 2015, 20, 763-770.

Zethelius B, Berglund L, Sundström J, Ingelsson E, Basu S, Larsson A, Venge P, Arnlöv J. Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*. 2008;358(20):2107-2116.

Zeng C, Shi X, Zhang B, Liu H, Zhang L, Ding W, Zhao Y. The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: relationship with metabolic factors and complications. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(2):175-186.

Zhang J, Fu Q, Ren Z, Wang Y, Wang C, Shen T, Wang G, Wu L. Changes of serum cytokines-related Th1/Th2/Th17 concentration in patients with postmenopausal osteoporosis. *Gynecol Endocrinol*. 2015;31(3):183-190.

Zhang S, Gang X, Yang S, Cui M, Sun L, Li Z, Wang G. The Alterations in and the Role of the Th17/Treg Balance in Metabolic Diseases. *Front Immunol*. 2021, 12, 678355.

Zhang X, Zhu Y, Zhou Y, Fei B. Interleukin 37 (IL-37) Reduces High Glucose-Induced Inflammation, Oxidative Stress, and Apoptosis of Podocytes by Inhibiting the STAT3-Cyclophilin A (CypA) Signaling Pathway. *Med Sci Monit*. 2020;26:e922979.

Zhu R, Sun H, Yu K, Zhong Y, Shi H, Wei Y, Su X, Xu W, Luo Q, Zhang F, Zhu Z, Meng K, Zhao X, Liu Y, Mao Y, Cheng P, Mao X, Zeng Q. Interleukin-37 and Dendritic Cells Treated With Interleukin-37 Plus Troponin I Ameliorate Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(12):e004406.

Zi C, He L, Yao H, Ren Y, He T, Gao Y. Changes of Th17 cells, regulatory T cells, Treg/Th17, IL-17 and IL-10 in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Endocrine*. 2022, 76, 263-272.

Zindel J, Kubes P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annu Rev Pathol*. 2020;15:493-518.

9. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Odrediti raspon vrijednosti citokina IL-17A i IL-37 u osoba starije dobi s T2D i utvrditi obilježja ispitanika s kojima su ti citokini povezani te i optimalne granične vrijednosti tih citokina i njihovu razdjelnu moć za vaskularne komplikacije i druga nepovoljna stanja povezana s T2D te je usporediti s onom standardnih upalnih biljega. Dodatni cilj bio je utvrditi optimalni broj i obilježja fenotipskih podskupina koje se mogu prepoznati u ispitanika korištenjem kliničkih i sociodemografskih podataka i upalnih markera.

Nacrt istraživanja: presječna studija

Ispitanici i metode: Ispitanici su bili oba spola, s dijagnozom T2D, stari 50 i više godina koji su samostalno mogli dolaziti svome izabranom liječniku obiteljske medicine, uz neke isključne čimbenike. Bilo je ukupno 170 ispitanika, izabranih konzekutivnom metoom probira. Istraživanje je provedeno tijekom četiri mjeseca, 2020. godine, u četiri ordinacije obiteljske medicine, u kojima su liječnici prihvatili sudjelovanje u istraživanju. Višestruki regresijski modeli korišteni su za procjenu povezanosti upalnih markera s drugim varijablama. Za utvrđivanje fenotipova, korištena je klaster metoda primjenom algoritma k-srednjih vrijednosti.

Rezultati: Citokin IL-17A je pokazao malu varijabilnost (IQR 0,21 – 3,21 pg/mL), dok je varijabilnost IL-37 bila veća, ali izrazito iskrivljena i u većine ispitanika je pokazivala niske vrijednosti (IQR 3,40 i 38,0 pg/mL). Citokini IL-17A i IL-37 su bili pozitivno povezani jedan s drugim, s tim da su vrijednosti IL-37 bile više ovisne o stupnjevima porasta IL-17A, nego što je to bio slučaj s IL-17A s obzirom na porast IL-37. Gerijatrijski sindrom krhkosti pokazao se kao najvažniji modificirajući čimbenik u povezanosti pojedinih čimbenika s varijacijama u vrijednostima IL-17A i IL-37. Bolesnici s T2D mogu se razvrstati u podskupine (fenotipove) na temelju spontanog okupljanja (klasteriranja) sociodemografskih i kliničkih obilježja koji opisuju te bolesnike, skupa s pripadajućim vrijednostima citokina IL-17A i IL-37. Tako definirani fenotipovi mogli bi se koristiti u praksi za razlikovanje bolesnika s T2D prema stupnju rizika za nastanak KV komplikacija i nepovoljnih ishoda. Prepoznavanje fenotipova je potrebno zbog velikih međusobnih razlika tih bolesnika s obzirom na antropometrijske mjere, komorbiditetna stanja, metaboličke parametre, stupanj upale te razvijenost stanja krhkosti.

Zaključak: Rezultati mogu pomoći u boljem razumijevanju faza kronične upale povezane s razvojem oštećenja organa i vaskularnih komplikacija u osoba s dijagnozom T2D i općenito sa stanjima povećanog KV rizika, što je od potencijalno praktične važnosti, zbog toga što su T2D i KVB glavni uzroci morbiditeta i mortaliteta u populaciji osoba starije dobi. Od velike važnosti je u budućim istraživanjima istaknuti tehnike klasteriranja, kako bi se iskoristio dijagnostički potencijal novih upalnih markera IL-17A i IL-37 u kompleksnim kroničnim bolestima kao što je T2D.

Ključne riječi: dijabetes tipa 2; starenje; kronična upala; IL-17A; IL-37; kompleksne kronične bolesti; pacijenti primarne zdravstvene zaštite; skriveni fenotipovi; tehnike klasteriranja

10. SUMMARY

Aims and Objectives: This study aimed to identify the range values of cytokines IL-17A and IL-37, in patients with T2D and to determine the characteristics of subjects, in which these cytokines were associated. Also the aim was to determine the discriminating power associated with vascular complications and target organ damage, compared to the standard set of inflammatory markers. Another aim was to identify the hidden phenotypes of patients with T2D, with variables indicating the sociodemographic and clinical contexts and set of inflammatory markers.

Study Design: Cross-Sectional Study

Subjects and Methods: Individuals of both gender, diagnosed with T2D, old 50 years and more, were recruited for the study. They were all mobile patients who could independently visit their family physicians with some exclusion criteria. The final number of participants was 170, chosen by the consecutive screening method. The study was conducted in 2020 for four months, in four PC practices, in which doctors accepted to participate in the study. Multiple regression models were used to assess associations of inflammatory markers with other variables. The k-means algorithm was used to determine the phenotypes.

Results: Cytokine IL-17A showed little variability (IQR 0.21 - 3.21 pg/mL), while the variability of IL-37 was higher, but extremely skewed and showed low values in most of individuals (IQR 3.40 and 38.0 pg/mL). The cytokines IL-17A and IL-37 were positively correlated with each other. IL-37 values have been more dependent of the degree of increase in IL-17A than in case of IL-17A with regard to the increase in IL-37. The geriatric frailty syndrome proved to be the most important modifying factor in the association of individual factors with variations in IL-17A and IL-37 values. Patients with T2D can be classified into subgroups (phenotypes) based on the spontaneous gathering (clustering) of sociodemographic and clinical characteristics that describe these patients, together with the corresponding values of cytokines IL-17A and IL-37. The phenotypes defined in this way could be used in everyday practice to differentiate patients with T2D according to the degree of risk for CV complications and adverse outcomes. Recognition of phenotypes is necessary due to the great mutual differences of these patients with regard to anthropometric measures, comorbid conditions, metabolic parameters, degree of inflammation and the development of the state of frailty.

Conclusion: The results of this study may help in better understanding of phases of chronic inflammatory response, associated with the development of organ damage and vascular complications in individuals diagnosed with T2D and in general with conditions of increased CV risk, which is of potentially practical importance, because T2D and CVD are the main causes of morbidity and mortality in to the population of elderly people. There is a great importance in future research to emphasize clustering techniques, in order to use the diagnostic potential of the new inflammatory markers IL-17A and IL-37 in complex chronic disease.

Keywords: diabetes type 2; aging; chronic inflammation; IL-17A; IL-37; complex chronic diseases; primary care patients; hidden phenotyping; clustering techniques

11. ŽIVOTOPIS

Rođen je 25. travnja 1991. u Slavonskom Brodu. Završio je opću gimnaziju „Matija Mesić“ u Slavonskom Brodu 2010. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Osijeku diplomirao je 2016. te stekao stručni naziv doktor medicine. Tijekom studija, boravio je na međunarodnim studentskim razmjenama u Japanu 2014., Kanadi 2015. i Austriji 2016. Pripravnički staž odradio je u Općoj bolnici „Dr. Josip Benčević“ Slavonski Brod 2017., te nakon položenog stručnog ispita pred ispitnom komisijom Ministarstva zdravstva RH, stekao odobrenje Hrvatske liječničke komore za samostalni rad. Od 2017. zaposlen je kao liječnik opće/ obiteljske medicine u Domu zdravlja Slavonski Brod te kao vanjski predavač medicinske grupe predmeta na Srednjoj medicinskoj školi u Slavonskom Brodu. Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti Sveučilišta J.J Strossmayera u Osijeku, Sveučilišta u Dubrovniku i Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu upisao je 2018. Od 2020. zaposlen je u Ordinaciji opće medicine Zvonimir Bosnić, koja je ugovoreni partner Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje. Iste godine započeo je i specijalističko usavršavanje iz obiteljske medicine pod mentorstvom prof. dr. sc. Ljiljane Trtice Majnarić i komentorstvom Blaženke Šarić, spec. obiteljske medicine. Od 2021. zaposlen je kao vanjski suradnik na Medicinskom fakultetu u Osijeku pri Katedri za obiteljsku medicinu. Tijekom specijalističkog usavršavanja pohađao je i položio pred ispitnom komisijom „Poslijediplomski tečaj iz ultrazvuka abdomena“ na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, tečaj „Ultrazvuk štitnjače i površinskih struktura glave i vrata“ pri Hrvatskom liječničkom zboru (HLZ) i Hrvatskom senološkom društvu; „Tečaj kardiopulmonalne reanimacije“ u organizaciji HLZ Slavonski Brod te Poslijediplomski specijalistički studij iz obiteljske medicine na Medicinskom fakultetu u Rijeci. Pohađao je i položio 10. tečaj trajne medicinske edukacije iz dermatoskopije „Uvod u dermatoskopiju“ i 7. tečaj trajne medicine dokumentacije iz područja dermatoskopije „Napredni tečaj dermatoskopije“ pri Kliničkom bolničkom centru Sestre Milosrdnice, Klinici za kožne i spolne bolesti, Referentnom centru za dermatoskopiju MZ-a RH i Referentnom centru za melanom MZ-a RH.

Član je Hrvatske liječničke komore od 2017., Hrvatskog liječničkog zbora od 2018. te EGPRN mreže istraživača (eng. European General Practice Research Network) od 2022.

Autor je i koautor više znanstvenih radova objavljenih u bazama WoS (Web of Science), Scopus i Medline. Aktivno je sudjelovao s usmenim prezentacijama na domaćim i međunarodnim

skupovima iz područja obiteljske medicine. Autor je i koautor više kongresnih priopćenja u zborniku radova.

POPIS PUBLIKACIJA

Originalni znanstveni rad (Q1, Q2, Q3, Q4)

1. Bekić S, Šabanovic S, Šarlija S, **Bosnić Z**, Volarić N. Lack of Relationships Between Serum Prolactin Concentrations and Classical Cardiovascular Risk Factors in Eastern Croatian Older Adults. *Med Sci Monit*, 2018; 24: 6900-6909.
2. Majnarić LT, Wittlinger T, Stolnik D, Babič F, **Bosnić Z**, Rudan S. Prescribing Analgesics to Older People: A Challenge for GPs. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020, 17, 4017.
3. Trtica Majnarić L, Guljaš S, **Bosnić Z**, Šerić V, Wittlinger T. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio as a Cardiovascular Risk Marker May Be Less Efficient in Women Than in Men. *Biomolecules*. 2021 11, 528.
4. Wittlinger T, **Bosnić Z**, Kurevija T, Majnarić Trtica LJ. Cardiovascular risk and aging – the need for a more comprehensive understanding. *J Geriatr Cardiol*. 2021, 18, 462-478.
5. Majnarić LT, **Bosnić Z**, Guljaš S, et al. Low Psychological Resilience in Older Individuals: An Association with Increased Inflammation, Oxidative Stress and the Presence of Chronic Medical Conditions. *Int J Mol Sci*. 2021, 22, 8970.
6. Guljaš S, **Bosnić Z**, Salha T, et al. Lack of Informations about COVID-19 Vaccine: From Implications to Intervention for Supporting Public Health Communications in COVID-19 Pandemic. *Int J Environ Res Public Health*. 2021, 18, 6141.
7. **Bosnić Z**, Šarić B, Vučić D, et al. Alopecia in preexisting autoimmune thyroid disease in family medicine practice: can hyperprolactinemia induce hair loss? A case report. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2021, 30, 75-77.
8. **Bosnić Z**, Yildirim P, Babič F, et al. Clustering Inflammatory Markers with Sociodemographic and Clinical Characteristics of Patients with Diabetes Type 2 Can Support Family Physicians' Clinical Reasoning by Reducing Patients' Complexity. *Healthcare (Basel)*. 2021, 9, 1687.

9. Holik D, **Bosnic Z**, Mikic M, Vucic D, Rudan S, Trtica-Majnarić L. First Referrals for Testing on Thyroid Disorders and the Influence of Age and Gender on Positive Test Results. *Clin Lab*. 2021, 67, 10.7754/Clin.Lab.2021.210152.
10. Majnarić LT, **Bosnić Z**, Štefanić M, Wittlinger T. Cross-Talk between the Cytokine IL-37 and Thyroid Hormones in Modulating Chronic Inflammation Associated with Target Organ Damage in Age-Related Metabolic and Vascular Conditions. *Int J Mol Sci*. 2022, 23, 6456.
11. Babič, F., Anderková, V., **Bosnić, Z.**, Volarić, M., Trtica Majnarić, L. (2022). SECI Model in Data-Based Procedure for the Assessment of the Frailty State in Diabetic Patients. In: Holzinger, A., Kieseberg, P., Tjoa, A.M., Weippl, E. (eds) *Machine Learning and Knowledge Extraction. CD-MAKE 2022. Lecture Notes in Computer Science*, vol 13480. Springer, Cham.
12. Bosnić Z, Babič F, Anderková V, Štefanić M, Wittlinger T, Majnarić LT. A Critical Appraisal of the Diagnostic and Prognostic Utility of the Anti-Inflammatory Marker IL-37 in a Clinical Setting: A Case Study of Patients with Diabetes Type 2. *Int J Environ Res Public Health*. 2023;20(4):3695.

Originalni znanstveni rad citiran u ISI (Q3, Q4)

1. Pajić Matić I, Karakatić M, Veselski K, Maslovara S, Matić I, **Bosnić Z**. Connection between knowledge of oral hygiene and dental status of the elderly in Požeško-slavonska County. *Medica Jadertina*. 2021, 51, 31-38.
2. Vučić D, **Bosnić Z**, Cvitkušić Lukenda K, Gabaldo K, Knežević Praveček M, Leko N i sur. Pathophysiological association of catecholamine stress in a patient with Takotsubo cardiomyopathy and chronic kidney disease: a case report. *Medicina Fluminensis*. 2021,157, 209-214.
3. **Bosnić Z**, Vučić D, Lozić A, Volarić M, Trtica Majnarić Lj. Specifics of Sex Life and Methods of Birth Control among Students at the University of Osijek. *Collegium antropologicum*. 2021, 45, 103-110.
4. Holik D, Milostić Srb A, Dumenčić B, **Bosnić Z**, Popić B, Trtica Majnarić Lj. The Relationship Between Appearance Satisfaction and Self-Esteem Among High School Students in Eastern Croatia. *Archives of Psychiatry Research*. 2022, 58(2):243-254.

Originalni znanstveni rad citiran u drugim bazama podataka

1. Majnarić Trtica Lj, **Bosnic Z**, Grdic I, Volaric M. Associations between Lifestyle Behaviors and Stress Related Symptoms in Senior Medical Students of the University of Osijek, Eastern Croatia. *Journal of Psychology and Behavioral Science*. 2018, 6, 1, 60-71.
2. Trtica Majnarić Lj, Bekić S, Bosnić Z. Mood disorders in later life and challenges of care in general/family medicine. *Med Fam Croat*. 2018, 26, 1-2.
3. Ljiljana Trtica Majnarić, František Babič, **Zvonimir Bosnić**, Marijana Zekić- Sušac and Thomas Wittlinger. The Use of Artificial Intelligence in Assessing Glucose Variability in Individuals with Diabetes Type 2 from Routine Primary Care Data. *International Journal of Diabetes and Clinical Research*, 2020, 7: 121, 7, 2.
4. Yıldırım Pinar, Trtica Majnarić Ljiljana, **Bosnic Zvonimir**, Volarić, Nikola. Complexity and Non-Linearity of Cardiovascular Risk Factors in Older Patients With Multimorbidity and Reduced Renal Function. *Journal of Integrative Cardiology Open Access*. DOI: 10.31487/j.JICOA.2020.02.04.
5. **Zvonimir Bosnić***, Marko Miškić, Karolina Veselski, Domagoj Vučić, Ljiljana Trtica Majnarić. Assessment of Nutritional Status of Elderly People in a Practice of Family Medicine in Relation to MNA Test, Comorbidity and Chronic Therapy. *Southeastern European Medical Journal*. 2019, 3, 2
6. Vučić Domagoj, Veselski Karolina, **Bosnić Zvonimir**. Effect of Iron deficiency anemia and other clinical conditions on hemoglobin A1c levels. *Southeastern European Medical Journal*. 2019, 3, 2.
7. Mila Vasilj Mihaljevic, **Zvonimir Bosnic**, Karolina Veselski, Domagoj Vucic, Ljiljana Trtica Majnaric. Mental and Cognitive Disorders in Older People With Subclinical Thyroid Conditions. *CPQ Neurology and Psychology*. 2020, 3, 01-06.
8. **Zvonimir Bosnić** , Ljiljana Trtica Majnarić , Marko Miškić , Karolina Veselski , Domagoj Vučić. Assessment of nutritional status of elderly people in a practice of family medicine in relation to anthropometric indices, comorbidity and renal function. *Med Fam Croat*, Vol 28, No1-2, 2020.
9. **Bosnic Z**, Saric B, Cocha B, Vucic D, Trtica Majnarić Lj. Lack of Awareness in Management and Monitoring of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) in

Patients aged 60 years and more in Primary Health Care: Short Communication. *Canc Therapy & Oncol Int J.* 2020, 17, 555964.

10. Bardak A, Stjepan Kovacevic, Kovacevic B, Vukovic Arar Z, Sekelj S, Nizic D, **Bosnic Z.** Association Between Diverse Diabetic Treatments and Duration of Diabetes Mellitus According to Progression of Diabetic Retinopathy: Experience From a Small Regional Hospital. *Southeastern European Medical Journal.* 2021, 5, 65-74.
11. **Bosnić Z,** Martuković M, Kelčić S, Šarić B, Jakobović T, Majnarić Trtica Lj. Individualizirani i pragmatični pristup u liječenju produljenog COVID-19 u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. *Medicina familiaris Croatica.* 2021, 29, 31-35.
12. **Zvonimir Bosnic,** Bozidar Kovacevic, Domagoj Vucic, Stjepan Kovacevic, Nikica Marinic, Silva Guljas, Ljiljana Trtica Majnaric. Severe difficulties in management of rare aortoiliac occlusive disease in patient with comorbidity in primary health care. Is Leriche syndrome unrecognized enough? A case report. *J case Rep Images Med.* 2021, 7, 100062Z09ZB2021.
13. Mišković A, Marinić N, **Bosnić Z,** Veselski K, Vučić D, Pajić Matić I. The Correlation between Iron Deficiency and Recurrent Aphthous Stomatitis: A Literature Review. *Southeastern European Medical Journal.* 2022, 6, 105-112.

Kongresna priopćenja- usmena prezentacija na međunarodnom skupu

1. **Bosnic Z,** Hadzibegovic I. Etiology and clinical outcomes of cardiac tamponade in a regional hospital with no on site cardiac surgery. International Medical Students' Congress Novi Sad IMSCNS, Srbija, 2015. Abstract Book (usmeno kongresno priopćenje, međunarodna recenzija).
2. Leko N, Bukal N, **Bosnic Z,** Kovacevic M, Leko NJ, Jelakovic B. Endemska nefropatija NAK u hrvatskom žarištu nekada i sada, postoji li uopće hrvatsko endemsko žarište? 7th Croatian symposium on Renal Replacement Therapy, DiaTransplant 2018. Abstract Book (usmeno kongresno priopćenje, međunarodna recenzija).
3. **Zvonimir Bosnić,** Ljiljana Trtica Majnarić. Uloga obiteljskog liječnika u palijativnoj medicini. Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I. kategorije: „ Osnove Palijativne medicine“, Osijek, 2021.
4. **Zvonimir Bosnić,** Mirjana Markutović, Blaženka Šarić, Domagoj Vučić, Božena Coha, Ljiljana Trtica Majnarić. Severe difficulties in early recognition and monitoring of

Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) in family medicine practice: Do we know enough? DNOOM 2021. Abstract Book (usmeno kongresno priopćenje, međunarodna recenzija).

5. **Zvonimir Bosnić**, Maja Miletić, Blaženka Šarić. Melanoma of nail unit. DNOOM 2022. Abstract Book (usmeno kongresno priopćenje, međunarodna recenzija).
6. Dragan Slijepčević, Maja Miletić, **Zvonimir Bosnić**, Blaženka Šarić. Difficulties in identifying and monitoring a patient with pancreatic cysts in a family medicine practice. DNOOM 2022. Abstract Book (usmeno kongresno priopćenje, međunarodna recenzija).
7. Maja Miletić, **Zvonimir Bosnić**, Domagoj Vučić, Blaženka Šarić, Ljiljana Trtica Majnarić. Chronic urticaria as a presenting sign of cholangiocarcinoma- case report from family medicine practice. DNOOM 2022. Abstract Book (usmeno kongresno priopćenje, međunarodna recenzija).
8. **Zvonimir Bosnić**, Ljiljana Trtica Majnarić. Uloga obiteljskog liječnika u palijativnoj medicini. Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I. kategorije: „Osnove Palijativne medicine“, Osijek, 2021. Abstract Book (usmeno kongresno priopćenje, međunarodna recenzija).
9. Dragan Slijepčević, Maja Miletić, **Zvonimir Bosnić**. Medical response to a major incident-hm, what next. 6. Kongres hitne medicine s međunarodnim sudjelovanjem, Vodice, 2022. Abstract Book (usmeno kongresno priopćenje, međunarodna recenzija).
10. Ljiljana Majnaric, **Zvonimir Bosnic**, Mario Stefanic. Phenotypic subtypes of older patients with diabetes - Are all patients diagnosed with diabetes type 2 the same? EGPRN, Istanbul, 2022. Abstract Book (usmeno kongresno priopćenje, međunarodna recenzija).

Kongresni sažetak u zborniku radova:

1. Bosnić Zvonimir, Marko Miškić, Karolina Veselski, Domagoj Vučić, Ljiljana Trtica Majnarić. Assesment of nutritional status of elderly people in a practice of family medicine in relation to MNA test, comorbidity and chronic therapy. Book of Abstracts of the 12th International Scientific and Professional Conference With food to health Osijek, Republika Hrvatska, 2019. str. 10-10 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo).

2. Jankovic D, Colakovic M, **Bosnic Z**, Brkić S, Turk T. Interventional radiology in the treatment of malignant biliary obstruction. Interantional medical student?s congress in Sarajevo, Bosna i Hercegovina, 2016. Abstract Book (poster, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo).
3. Dunja Stolnik, Ivon Matić, Tea Pandurić, Tereza Solocki-Matić, Stjepan Kelčić, **Zvonimir Bosnić**, Sanja Bekić, Ljiljana Trtica Majnarić. Analgetici u obiteljskoj medicine: Tko, što i zašto? 10. Kongres Društva nastavnika opće/obiteljske medicine (DNOOM), Zagreb, ožujak 09-12, 2019, (poster, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo).
3. Kovacevic M, **Bosnic Z**, Bukal N, Leko N, Leko NJ, Stefanovic I. Naša iskustva liječenja plazmaferezom u centru za dijalizu OB “Dr Josip Benčević”. 7th Croatian symposium on Renal Replacement Therapy, DiaTransplant 2018. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo).
4. Ivon Matić, Dunja Stolnik, **Zvonimir Bosnić**, Mila Vasilj-Mihaljević, Sanja Bekić, Ljiljana Trtica Majnarić. Izvori “evidence based medicine” informacija među studentima 6. Godine medicine. 10. Kongres Društva nastavnika opće/obiteljske medicine (DNOOM), Zagreb, 2019 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo).
5. Domagoj Vucic, Marijana Kovacevic, **Zvonimir Bosnić**, Karolina Veselski, Matej Tomas, Martina Juzbasic. Takotsubo cardiomyopathy presenting with ST elevation in patient with an end stage renal disease on haemodialyis program:case report. International Translational Medicine Congress of Students and Young Physicians - Abstract Book, Osijek: University of Osijek, Faculty of Medicine, 2020. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo)
6. Karolina Veselski, **Zvonimir Bosnić**, Domagoj Vučić, Matej Tomas, Martina Juzbašić. A Review on Platelet Activating Factor Inhibitor Lexipafant: Could Lexipafant be a Standard in the Treatment of Sepsis? International Translational Medicine Congress of Students and Young Physicians - Abstract Book, Osijek: University of Osijek, Faculty of Medicine, 2020. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo).
7. **Zvonimir Bosnić**, Ljiljana Trtica Majnarić. Diferencijalna dijagnoza kroničnog kašlja u starijih osoba u ambulanti obiteljske medicine. Tečaj trajne edukacije 1. kategorije. Hrvatsko društvo za alergologiju i kliničku imunologiju, HLZ, Medicinski fakultet Osijek, 2020. (poster, sažetak, ostalo).

8. **Zvonimir Bosnić**, Karolina Veselski, Domagoj Vučić, Ljiljana Trtica Majnarić. Stanje uhranjenosti i kronične respiratorne bolesti u starijih osoba s komorbiditetom u ambulanti obiteljske medicine. Tečaj trajne edukacije 1. kategorije. Hrvatsko društvo za alergologiju i kliničku imunologiju, HLZ, Medicinski fakultet Osijek, 2020. (poster, sažetak, ostalo).

9. Filip Cikoja, Christian Kurina, Laura Ivanović- Martić, Tena Zovkić, Ana Bardak, **Zvonimir Bosnić**. Progressive weight loss in uncommon condition of acquired central diabetes insipidus (CDI): case report. International Translational Medicine Congress of Students and Young Physicians - Abstract Book, Osijek: University of Osijek, Faculty of Medicine, 2022. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, ostalo).

Okrugli stol- organizacija

Tečaj trajne edukacije 1. kategorije. Kronične respiratorne bolesti na sučelju primarne i sekundarne zaštite. Hrvatsko društvo za alergologiju i kliničku imunologiju, HLZ, Medicinski fakultet Osijek. Član organizacijskog odbora, predavač. Osijek (27.-28.3.2020).

Tečaj trajne medicinske izobrazbe „Škola ORL u ambulanti obiteljske medicine i hitne medicine“ u organizaciji Odjela za bolesti uha, grla i nosa OB Slavonski Brod, Službe za opću/ obiteljsku medicinu Dom zdravlja Slavonski Brod, Zavoda za HMP Slavonski Brod, Hrvatskog liječničkog zbora, Slavonski Brod. Član organizacijskog odbora, predavač. Slavonski Brod 21.03. 2020.

Potvrda Medicinskog fakulteta u Osijeku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Laboratorija za neurobiologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku i Studentske sekcije za neuroznanost - glavni koordinator aktivnosti povodom 16. Tjedna mozga za grad Slavonski Brod

Sudjelovanje na domaćem ili međunarodnom skupu bez priopćenja

Certificate of participation in the 7th Annual International Medical Students Meeting, held at Faculty of Medicine of the University of Lisbon 2016.

Potvrda o sudjelovanju na 5. brodskom simpoziju o alkoholizmu, kockanju i modernim ovisnostima. Moderne ovisnosti u kontekstu zaštite mentalnog zdravlja. Tečaj 1. kategorije, Slavonski Brod 2017. Katedra za javno zdravstvo, Medicinski fakultet Osijek.

Potvrda o sudjelovanju na Poslijediplomskom tečaju trajnog medicinskog usavršavanja 1. kategorije Primarne i sekundarne bolesti glomerula 2018. Zavod za nefrologiju i dijalizu KB

Dubrava, Klinička jedinica za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju KB Dubrava, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Potvrđnica o sudjelovanju na 6. Simpoziju- Odabran teme iz dijalize 2018. Hrvatsko društvo za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju, Poliklinika za internu medicinu i dijalizu B.Braun Avitum Zagreb, Zavod za nefrologiju Klinike za unutranje bolesti KB Merkur, Zavod za nefrologiju i dijalizu Klinike za unutarnje bolesti KBC Sestre milosrdnice Zagreb.

Epidemiologija arterijske hipertenzije i unos kuhinjske soli u Hrvatskoj (EH-UH 2). Projekt Hrvatske zaklade za znanost (IP-06-2016). Bojan Jelaković, Vesna Bajer, Maja Banadinović, Lovorka Bilajac, Krunoslav Capak, Edina Čatić Čuti, Aleksandar Džakula, Lana Gellineo, Ante Ivančić, Ana Jelaković, Tamara Knežević, Branimir Krtalić, Goran Lazić, Ninoslav Leko, Mihaela Marinović Glavić, Borna Miličić, Davorka Rakić, Marijana Sarić, Ana Stupin, Marko Stupin, Vanja Vasiljev-Marchesi, Ranko Stevanović. Istraživački tim i suradnici projekta po regijama koje su do sada uključeni. Koordinator: Ninoslav Leko, Marijana Sarić, Josip Samardžić. Suradnici: Mirta Abramović Barić, Mirjana Blažević, **Zvonimir Bosnić**, Nikolina Bukal, Danijela Daus – Šebedak, Spomenka Junačko, Maria D. Križanović, Vesna Matijević, Anica Perić, Sanja Samardžić, Darija Stvorić, Ines Zelić

Studijski boravak u laboratoriju (do 1 mjesec)

Certificate of International Federation of Medical Students' Associations, Laboratory of neurogenetics, Research Centre Montreal, Institut Univeristariae en sante mentale de Montreal, Canada, in period of 31st July – 31st August 2015, under supervision prof. Lan Xiong, for successfully completed research exchange project entitled " Genetic studies of large consanguineous pedigree with major psychiatric disorder from Pakistan

Ostalo

Certificate of Completion, Rave EDC Essentials for Investigators with Data Entry, eLearning course. Oct 2018. – u sklopu istraživanja stimulatora eritropoezeu bolesnika na hemodijalizi