

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

MARKO GRAHOVAC, dr. med.

**POVEZANOST ENDOKANABINOIDA, KRAJNJIH PRODUKATA GLIKACIJE I
PRIDRŽAVANJA MEDITERANSKOJ PREHRANI U PREDIJABETESU**

DOKTORSKI RAD

SPLIT, 2026.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

MARKO GRAHOVAC, dr. med.

**POVEZANOST ENDOKANABINOIDA, KRAJNJIH PRODUKATA GLIKACIJE I
PRIDRŽAVANJA MEDITERANSKOJ PREHRANI U PREDIJABETESU**

DOKTORSKI RAD

SPLIT, 2026.

Ovaj rad izrađen je u Regionalnom centru za dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog bolničkog centra u Splitu te u Laboratoriju za kardiometabolička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Voditelj rada:

prof. dr. sc. Joško Božić, dr. med.

ZAHVALA

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Definicija predijabetesa i dijagnostički kriteriji.....	2
1.2. Epidemiologija predijabetesa	7
1.3. Probir i dugoročni ishodi bolesnika s predijabetesom	11
1.4. Etiologija i patofiziologija predijabetesa	15
1.5. Terapijski pristup u osoba s predijabetesom	20
1.6. Krajnji produkti glikacije.....	26
1.7. Endokanabinoidni sustav	30
1.8. Mediteranska dijeta.....	38
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	41
2.1. Glavni ciljevi istraživanja	42
2.2. Sporedni ciljevi istraživanja	42
2.3. Hipoteze istraživanja	42
3. ISPITANICI I POSTUPCI.....	43
3.1. Ispitanici	44
3.2. Postupci.....	45
3.3. Statistička analiza podataka	47
3.4. Izračun veličine uzorka	49
4. REZULTATI	50
5. RASPRAVA.....	66
6. ZAKLJUČCI	74
7. SAŽETAK.....	76
8. SUMMARY.....	78
9. LITERATURA	81
10. ŽIVOTOPIS.....	104

POPIS OZNAKA I KRATICA (prema redoslijedu pojavljivanja u tekstu)

IGT	poremećaj tolerancije glukoze (engl. <i>Impaired glucose tolerance</i>)
OGTT	oralni test opterećenja glukozom (engl. <i>Oral glucose tolerance test</i>)
mmol/L	milimol po litri
IFG	poremećaj glikemije natašte (engl. <i>Impaired fasting glucose</i>)
ADA	Američko dijabetološko društvo (engl. <i>American Diabetes Association</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)
IDF	Međunarodna dijabetološka federacija (engl. <i>International Diabetes Federation</i>)
HbA1c	glikirani hemoglobin A1c
T2DM	dijabetes melitus tip 2 / šećerna bolest tip 2
ITM	indeks tjelesne mase
HIV	virus humane imunodeficijencije (engl. <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
ASCVD	aterosklerotska kardiovaskularna bolest (engl. <i>Atherosclerotic cardiovascular disease</i>)
MASLD	steatotička bolest jetre povezana s metaboličkim poremećajem (engl. <i>Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease</i>)
NEFA / FFA	neesterificirane masne kiseline (engl. <i>Non-esterified fatty acids / Free fatty acids</i>)
GLUT4	transporter glukoze tipa (engl. <i>Glucose Transporter Type</i>) 4
IRS 1	protein inzulinskog receptor-substrata (engl. <i>Insulin receptor substrate</i>) 1
PI3K	fosfatidilinozitol 3-kinaza
PIP3	fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat
PIP2	fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat
PKB	protein kinaza B
GSK3 α/β	protein kinaza sintaze glikogena (engl. <i>Glycogen synthase kinase</i>) 3 α/β
SHC	protein homologan Src-u i kolagenu (engl. <i>Src homology and collagen adaptor protein</i>)
MAPK	mitogen-aktivirana protein kinaza
ERK	ekstracelularnim signalom regulirana kinaza
TNF	tumor-nekrotizirajući faktor
GLP-1	glukagonu sličan peptid (engl. <i>Glucagon-like peptide</i>) 1
GIP	inzulintropni polipeptid ovisan o glukozu (engl. <i>Glucose-dependent insulintropic polypeptide</i>)

FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (engl. <i>U.S. Food and Drug Administration</i>)
SGLT2i	inhibitori kotransportera natrija i glukoze (engl. <i>Sodium-glucose co-transporter inhibitors</i>) 2
HOMA-IR	model procjene homeostaze za inzulinsku rezistenciju (engl. <i>Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance</i>)
AGEs	krajnji produkti uznapredovale glikacije (engl. <i>Advanced glycation end products</i>)
ROS	reaktivni kisikovi spojevi (engl. <i>Reactive oxygen species</i>)
SAF	autofluorescencija tkiva kože (engl. <i>Skin autofluorescence</i>)
RAGEs	receptor za krajnje produkte uznapredovale glikacije (engl. <i>Receptor for advanced glycation end-products</i>)
NF-κB	nuklearni transkripcijski faktor kappa B (engl. <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
JNK	c-Jun N-terminalna kinaza
ECS	endokanabinoidni sustav (engl. <i>Endocannabinoid system</i>)
CB ₁ R	endokanabinoidni receptor 1
CB ₂ R	endokanabinoidni receptor 2
eCB	endokanabinoidi
AEA	arahidonoiletanolamid
2-AG	2-arahidonoilglicerol
DAG	diacilglicerol
AA	arahidonska kiselina
NAT	N-acil-transferaza
NAPE	N-acil-fosfatidiletanolamin
NAPE-PLD	N-arahidonoil-fosfatidiletanolamin fosfolipaza tipa D
FAAH-1	amidna hidrolaza masnih kiselina (engl. <i>Fatty Acid Amide Hydrolase</i>) 1
EtNH ₂	etanolamin
PLC	fosfolipaza C
MAGL	monoacilglicerol lipaza
GPCR	receptori spregnuti s G proteinom (engl. <i>G protein-coupled receptors</i>)
PPAR	receptori aktivirani proliferatorom peroksisoma (engl. <i>The peroxisome proliferator-activated receptors</i>)

TRPV1	prolazni receptorski potencijalni kationski kanal podfamilije V, član 1 (engl. <i>Transient Receptor Potential Vanilloid</i>)
GABA	gama-aminomaslačna kiselina (engl. <i>Gamma-aminobutyric acid</i>)
cAMP	ciklički adenzin monofosfat
PKA	proteinska kinaza A
RXR	retinoid X receptor
PPRE	element odgovora na aktivatore peroksisoma (engl. <i>Peroxisome Proliferator Response Element</i>)
ATP	adenozin trifosfat
MD	mediteranska prehrana (engl. <i>Mediterranean diet</i>)
WHR	omjer opsega struka i opsega bokova (engl. <i>Waist-to-hip ratio</i>)
ESC	Europsko kardiološko društvo (engl. <i>The European Society of Cardiology</i>)

1. UVOD

1.1. Definicija predijabetesa i dijagnostički kriteriji

Predijabetes je kronično reverzibilno metaboličko stanje obilježeno poremećajem metabolizma ugljikohidrata, pri čemu razine glikemije ne dosežu vrijednosti potrebne za postavljanje dijagnoze dijabetesa (1, 2).

Pojam poremećaj tolerancije glukoze (engl. *Impaired glucose tolerance*, IGT) uveden je u kliničku praksu u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) krajem 1970-ih i odnosio se na metaboličko stanje u kojem je vrijednost glikemije dva sata nakon testa oralnog opterećenja glukozom (engl. *Oral glucose tolerance test*, OGTT) iznosila između 7,8 i 11,1 mmol/L, dok su vrijednosti glikemije natašte bile ispod dijagnostičkog praga za postavljanje dijagnoze dijabetesa prema tadašnjim smjernicama (3). Pojam poremećaj glikemije natašte (engl. *Impaired fasting glucose*, IFG) u kliničku praksu je uveden 1997. godine i tada je definiran kao vrijednost glikemije natašte između 6,1 i 6,9 mmol/L. U osoba koje su zadovoljavale ove dijagnostičke kriterije zabilježen je povećan rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti (4).

U reviziji dijagnostičkih kriterija iz 2003. godine, prema preporuci Američkog dijabetološkog društva (engl. *American Diabetes Association*, ADA) smanjena je donja granica raspona glikemije natašte za definiciju IFG-a s dotadašnjih 6,1 mmol/L na 5,6 mmol/L (5). Unatoč tome, Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*, WHO) i Međunarodna dijabetološka federacija (engl. *International Diabetes Federation*, IDF) zadržale su u svojim smjernicama preporuku da se IFG definira vrijednostima glikemije natašte između 6,1 i 6,9 mmol/L (6), zbog čega i danas postoji bitna razlika u dijagnostičkim kriterijima za postavljanje dijagnoze IFG-a među vodećim svjetskim stručnim udruženjima.

Od 1980-ih godina, glikirani hemoglobin A1c (HbA1c) predstavlja ključni biomarker u praćenju kontrole glikemije u osoba s postavljenom dijagnozom dijabetesa. Razvoj i implementacija programa za standardizaciju mjerenja HbA1c, doveli su do povećanja pouzdanosti i usporedivosti rezultata među laboratorijima širom svijeta, što je u konačnici omogućilo i široku primjenu HbA1c kao jednog od dijagnostičkih kriterija za postavljanje dijagnoze dijabetesa (7). Međunarodni stručni odbor preporučio je kako se osobe s vrijednostima HbA1c iznad gornje granice normale, ali ispod dijagnostičkog praga za postavljanje dijagnoze dijabetesa, smatraju skupinom populacije s visokim rizikom za razvoj dijabetesa melitusa tip 2 (T2DM) te kako je to ciljana skupina u kojoj bi trebalo provoditi učinkovite intervencije radi prevencije ili odgode nastanka bolesti. Ova ciljana skupina s tzv. „graničnom hiperglikemijom“ definirana je vrijednostima HbA1c između 6,0 i 6,4%. Prema

smjernicama ADA-e iz 2010. godine preporučeno je snižavanje donje granice dijagnostičkog raspona HbA1c za postavljanje dijagnoze predijabetesa na 5,7%, s ciljem pravovremenog identificiranja osoba s poremećenim metabolizmom glukoze i onih s povećanim kardiovaskularnim rizikom (8). Međutim, WHO za sada nije službeno preporučila primjenu HbA1c među testovima za postavljanje dijagnoze predijabetesa (7).

Određivanje vrijednosti glukoze u kliničkoj praksi odlikuje se niskom cijenom i širokom dostupnošću, no interpretacija rezultata ograničena je izraženom dnevnim varijabilnošću i nužnim osmosatnim gladovanjem pred uzorkovanje krvi. Nadalje, na rezultat mjerenja utječu brojni čimbenici poput unosa hrane, tjelesne aktivnosti, akutne bolesti (infekcije), razine stresa, kao i sama laboratorijska obrada uzorka, što zahtijeva strogu preanalitičku kontrolu (1, 9). Dodatno, kod određivanja vrijednosti glukoze u sklopu OGTT-a važna je odgovarajuća prethodna prehrana, budući da restrikcija ugljikohidrata nekoliko dana pred provođenje testa može dovesti do lažno povišenih postprandijalnih vrijednosti i posljedično lažno pozitivnog nalaza (1, 10). Nasuprot tome, određivanje HbA1c omogućuje praktičniju i stabilniju procjenu kronične izloženosti hiperglikemiji tijekom prethodnih približno 120 dana, bez potrebe za prethodnim gladovanjem i uz manju podložnost utjecaju gore navedenih akutnih čimbenika i kratkoročnih promjena. Ipak, kao neizravni pokazatelj glikemije, HbA1c može biti značajno izmijenjen u stanjima koja utječu na koncentraciju hemoglobina ili životni vijek eritrocita, uključujući anemiju, hemoglobinopatije, nadomještanje bubrežne funkcije hemodijalizom, liječenje eritropoetinom te određene genetske varijante, zbog čega kliničku primjenu određivanja HbA1c treba tumačiti u širem kliničkom kontekstu (1).

Prema posljednjim smjernicama ADA-e predijabetes se definira prisutnošću povišenih vrijednosti glikemije natašte (5,6-6,9 mmol/L) i/ili poremećaja tolerancije glukoze u OGTT-u (7,8-11,0 mmol/L 2 sata nakon unosa glukoze) i/ili povišenim vrijednostima glikiranog hemoglobina (5,7-6,4 %) (1), dok se aktualne smjernice za postavljanje dijagnoze predijabetesa od strane WHO-a temelje na procjeni IGT i/ili IFG. Iako se oba stručna udruženja slažu oko referentnih vrijednosti u slučaju IGT-a, ADA preporučuje niži prag vrijednosti za definiranje IFG-a u usporedbi sa smjernicama WHO-a (1, 7, 11). Izmjena dijagnostičkih kriterija predložena od strane ADA-e rezultirala je porastom prevalencije predijabetesa na globalnoj razini. Jedno od obrazloženja za ovu izmjenu bilo je nastojanje da se unutar populacije s predijabetesom postigne veća uravnoteženost u zastupljenosti osoba s IFG-om i IGT-om. Međutim, navedena je promjena istodobno otvorila opsežnu i još uvijek otvorenu stručnu raspravu, osobito imajući u vidu činjenicu da WHO nije prihvatila navedene izmjene sugerirane

od strane ADA-e. Slijedom toga, u literaturi postoje oprečna stajališta o metodološkoj i kliničkoj opravdanosti snižavanja graničnih vrijednosti IFG-a u procjeni rizika budućega razvoja T2DM (1).

IFG definiran prema ADA-inim kriterijima danas predstavlja najzastupljeniji oblik disglukemije. Ipak, upravo je snižavanje granične vrijednosti za postavljanje dijagnoze IFG-a predmet kontinuiranih prijedora u znanstvenoj zajednici, ponajprije zbog zapažanja da je stopa progresije prema T2DM u osoba s dominantno inzulinskom rezistencijom jetre, koja je obilježje IFG-a, niža nego u osoba u kojih prevladava inzulinska rezistencija skeletne muskulature, karakteristična za IGT. U tom je kontekstu iznesena pretpostavka da inzulinska rezistencija skeletnih mišića predstavlja primarni poremećaj u razvoju T2DM. Međutim, premda je inzulinska rezistencija skeletne muskulature nedvojbeno važan čimbenik rizika, istodobno postoje argumenti kako je u središtu patofiziologije hiperglikemije u sklopu T2DM zapravo jetrena, a ne mišićna inzulinska rezistencija. Dodatno, funkcija β -stanica narušena je već u fazi IFG-a, pri čemu se stupanj disfunkcije progresivno pogoršava s porastom koncentracije glukoze u plazmi natašte. U tom se smislu IFG može promatrati kao rani metabolički pokazatelj početne progresije rizika, koja s vremenom može voditi prema IGT-u i, konačno, prema razvoju T2DM (12).

Upravo zbog činjenice da se dijagnostički kriteriji i terminologija vezana uz predijabetes znatno razlikuju među različitim svjetskim stručnim organizacijama, nužan je oprez prilikom tumačenja i prikazivanja podataka o globalnoj prevalenciji i incidenciji predijabetesa (11). Važno je istaknuti da zasad ne postoji jedinstvena definicija predijabetesa koja bi bila univerzalno prihvaćena u istraživačkoj i zdravstvenoj zajednici (12). Dijagnostički kriteriji za postavljanje dijagnoze predijabetesa, koji proizlaze iz rezultata epidemioloških, patofizioloških i intervencijskih istraživanja, koja su utvrdila povezanost s vjerojatnošću razvoja T2DM i povećan rizik za razvoj kardiovaskularnih komplikacija, prikazani su u **Tablici 1**.

Tablica 1 Kriteriji za postavljanje dijagnoze predijabetesa sukladno smjernicama ADA-e odnosno WHO-a (1,2,7).

Parametar	ADA	WHO
HbA1c (%)	5,7 – 6,4	/
glikemija natašte (mmol/L)	5,6 – 6,9	6,1 – 6,9
glikemija u OGTT-u – nakon 2h (mmol/L)	7,8 – 11,0	7,8 – 11,0

Kratice: ADA – Američka dijabetološka organizacija (engl. *American Diabetes Association*); WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*); HbA1c – glikirani hemoglobin A1c; OGTT – oralni test opterećenja glukozom (engl. *Oral glucose tolerance test*)

Vrijednosti IFG-a i IGT-a ne moraju nužno istodobno biti patološke u istog bolesnika da bi se postavila dijagnoza predijabetesa. Prema smjernicama ADA-e, za postavljanje dijagnoze dovoljno je odstupanje u barem jednom od navedenih testova, što znači da će u nekih bolesnika predijabetes biti prepoznat na temelju izoliranog IFG-a, a u drugih na temelju izoliranog IGT-a. Iako globalno rjeđe korišten u probiru predijabetesa u kliničkoj praksi, HbA1c je praktičan i stabilan pokazatelj dugoročnije glikemijske izloženosti, no ne identificira nužno istu populaciju kao IFG ili IGT te ima ograničenja povezana s etničkim, rasnim i spolnim razlikama, uz ranije spomenutu ograničenu primjenu u stanjima koja mijenjaju životni vijek eritrocita ili proces glikacije hemoglobina (1, 11, 13-14).

Objašnjenje činjenice da WHO nije uvrstila HbA1c kao jedan od testova u sklopu probira u postavljanju dijagnoze predijabetesa, osim gore navedenog, može se pronaći i u činjenici da je HbA1c ograničeno dostupan u slabije razvijenim zemljama kao i u tome što u određenoj mjeri ovisi o etničkoj i rasnoj pripadnosti (2, 11, 15). Velike studije usmjerene na prevenciju diabetesa, uključujući veliku multicentričnu studiju „*Diabetes Prevention Program*“ i *follow-up* studiju „*Diabetes Prevention Program Outcomes Study*“, nisu koristile HbA1c kao jedan od kriterija pri uključanju ispitanika, no treba napomenuti kako u vrijeme pokretanja spomenutog istraživanja HbA1c još nije bio standardizirana mjera za procjenu glukoregulacije. Unatoč tome, naknadne analize podataka dobivenih u sklopu navedenih studija, pokazale su da je inicijalna vrijednost HbA1c bila snažan i neovisan prediktor rizika za razvoj T2DM-a (16, 17).

Oslanjanje isključivo na IFG za postavljanje dijagnoze predijabetesa dovelo bi do propusta u prepoznavanju velikog broja osoba s visokim rizikom, koje imaju izolirani IGT, a koji se može dijagnosticirati isključivo na temelju određivanja vrijednosti glukoze u plazmi

tijekom OGTT-a. Time bi se potencijalno propustilo rano razdoblje kada su potencijalne mogućnosti za (ne)farmakološke intervencije najučinkovitije (18).

Rezultati sustavnog pregleda i metaanalize *Sathisha i sur.* upućuju na to da učinak konvencionalnih intervencija usmjerenih na promjenu životnog stila na incidenciju T2DM nije jednak među različitim fenotipovima predijabetesa. Statistički značajno smanjenje rizika zabilježeno je u osoba s izoliranim IGT-om te u onih s istodobno prisutnim IFG-om uz IGT, dok takav učinak nije potvrđen u osoba s izoliranim IFG-om. Uočene razlike u smanjenju rizika vjerojatno se ponajprije mogu objasniti razlikama u patofiziološkim obilježjima pojedinih fenotipova predijabetesa. Naime, osobe s izoliranim IFG-om karakterizira smanjeno rano lučenje inzulina uz istodobno povećanu inzulinsku rezistenciju jetre, dok je fenotip izoliranog IGT-a obilježen smanjenim ranim i kasnim lučenjem inzulina te pojačanom inzulinskom rezistencijom skeletnih mišića. Fenotip IFG + IGT obuhvaća kombinaciju navedenih patofizioloških poremećaja. Navedene razlike između osoba s IGT-om i i-IFG-om upućuju na mogućnost da za učinkovito sprječavanje progresije u T2DM mogu biti potrebni različiti terapijski pristupi (19).

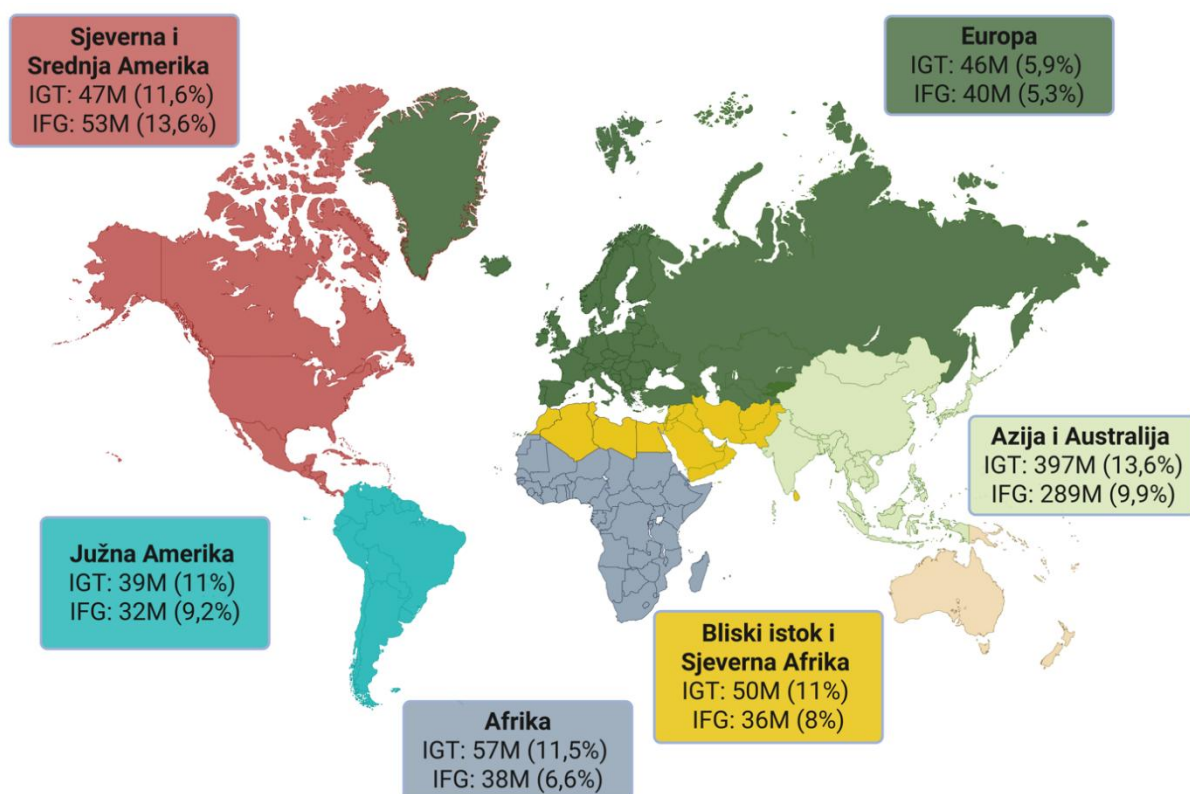
Prema trenutno globalno prihvaćenoj definiciji, IGT se može dijagnosticirati isključivo mjerenjem koncentracije glukoze u plazmi dva sata nakon oralnog opterećenja standardiziranom količinom glukoze, pri čemu se vrijednosti između 7,8 i 11,0 mmol/L smatraju dijagnostičkima za IGT (20). Stoga postoji snažna znanstvena i javnozdravstvena osnova za preporuku korištenja OGTT-a u probiru i dijagnosticiranju predijabetesa, osobito u srednje i nisko razvijenim zemljama. Osim već spomenutih ograničenja korištenja HbA1c, provođenje OGTT-a od strane educiranog nemedicinskog osoblja predstavlja ekonomski isplativiju opciju. Pravodobno prepoznavanje osoba s IGT-om otvara prostor za prevenciju ili odgodu razvoja T2DM-a, posebice s obzirom na to da rana uspostava odgovarajuće regulacije glikemije dokazano pridonosi smanjenju dugoročnog rizika od mikrovaskularnih i/ili makrovaskularnih komplikacija te ukupne smrtnosti (21, 22).

Preporuke ADA-e redovito se ažuriraju u skladu s najnovijim znanstvenim spoznajama te se smatraju široko prihvaćenima na globalnoj razini u odnosu na ostale relevantne izvore. S obzirom na postojanje različitih dijagnostičkih kriterija za postavljanje dijagnoze predijabetesa, ne iznenađuje činjenica da se brojnost populacije oboljele od predijabetesa znatno razlikuje ovisno o izvoru (11).

1.2. Epidemiologija predijabetesa

Postoji djelomično preklapanje između populacija oboljelih od predijabetesa obuhvaćenim pojedinim dijagnostičkim testom; samo 20 do 25 % osoba s IGT-om istovremeno zadovoljava i dijagnostičke kriterije za IFG, dok između 30 i 45 % osoba s IFG-om zadovoljava i dijagnostičke kriterije za IGT (23). Procjene prevalencije predijabetesa u odrasloj populaciji u dobi između 20 do 79 godina pokazuju značajne regionalne razlike, ali jasne rastuće globalne trendove.

U 2024. godini, oko 634,8 milijuna odraslih osoba u svijetu (oko 12,0 % odrasle populacije između 20 i 79 godina) imalo je IGT, pri čemu je dobno standardizirana prevalencija bila najviša u Jugoistočnoj Aziji, a najniža u Europi. U istoj godini, oko 487,7 milijuna odraslih osoba u svijetu (oko 9,2 % odrasle populacije) imalo je IFG, pri čemu je dobno standardizirana prevalencija bila najviša u regijama Sjeverne Amerike i Kariba, a najniža u Europi. Predviđa se da će do 2050. godine broj odraslih s IGT-om porasti na 846,5 milijuna, što predstavlja oko 12,9 % odrasle populacije, dok će broj odraslih s IFG-om porasti na 647,5 milijuna, odnosno oko 9,8 % odrasle populacije na globalnoj razini (24). Regionalne procjene prevalencije IGT-a i IFG-a u odrasloj populaciji između 20 i 79 godina za 2024. godinu prikazane su na **Slici 1**.



Slika 1. Regionalne procjene prevalencije IGT-a i IFG-a u odrasloj populaciji između 20 i 79 godina za 2024. godinu prikazane ukupnim brojem i postotkom odraslih osoba koji prema vrijednosti IGT-a i IFG-a zadovoljavaju kriterije za dijagnozu predijabetesa. IGT je definiran kao vrijednost glukoze u plazmi dva sata nakon oralnog opterećenja glukozom između 7,8 i 11,0 mmol/L. IFG je definiran kao glukoza natašte u plazmi između 6,1 i 6,9 mmol/L. Kratice: M – milijun; IFG – poremećaj glukoze natašte (engl. *Impaired fasting glucose*); IGT – poremećaj tolerancije glukoze (engl. *Impaired glucose tolerance*). Napravljeno u <https://BioRender.com>.

Neovisno o dijagnostičkom kriteriju, bilježi se značajan porast prevalencije predijabetesa u posljednjih nekoliko godina. Ukoliko pogledamo podatke za 2021. godinu, sukladno izvještaju IDF-a objavljenom u 10. izdanju Dijabetološkog atlasa, u odrasloj populaciji između 20 i 79 godina starosti prevalencija IGT-a iznosila je 9,1 %, dok je prevalencija IFG-a bila 5,8 % (25). Dodatno, u gore navedenim podacima kao referentne vrijednosti IFG-a i IGT-a u postavljanju dijagnoze predijabetesa uzete su one prema preporukama WHO-a, a ne prema nešto „strožim“ preporukama ADA-e, tako da je stvaran broj oboljelih od predijabetesa vjerojatno bio i veći (23, 24).

Globalne procjene prevalencije predijabetesa temeljenog na određivanju HbA1c trenutačno ne postoje, dijelom zbog ograničene primjene ovog pokazatelja u mnogim

zemljama, što je posljedica njegove relativno visoke cijene, nedostupnosti u svim područjima svijeta, te smanjene pouzdanosti u određenim populacijama (2).

Unatoč značajnim pomacima u ukupnom broju zemalja koje su objavile izvorne podatke o prevalenciji IGT-a i IFG-a, što je smanjilo potrebu za ekstrapolacijom podataka u odnosu na prethodno izdanje Dijabetološkog atlasa, i dalje se radi o manje od polovice – približno 40% od ukupnog broja zemalja. Prevalencija IGT-a i IFG-a razmatrana je zasebno (rijetke su zemlje i dijabetološka udruženja uopće izvještavali o zajedničkoj prevalenciji) te nije bilo mogućnosti pouzdano izračunati globalnu prevalenciju predijabetesa (uz IGT i IFG, temeljenu i na izračunu HbA1c) jer su takvi udruženi podaci dostupni tek za mali broj zemalja (24).

Prema klasifikaciji Svjetske banke za 2024. godinu, dobno standardizirana prevalencija IGT-a bila je najviša u zemljama sa srednjim dohotkom (12,3%), a najniža u zemljama sa visokim dohotkom (10,4%). Kada je riječ o IFG-u, najveća prevalencija također je zabilježena u zemljama sa srednjim dohotkom (9,5%), dok su zemlje s niskim dohotkom imale nižu stopu prevalencije (6,7%). Očekuje se da će prevalencija i IGT-a i IFG-a porasti u svim kategorijama dohotka populacije prema klasifikaciji Svjetske banke, pri čemu se najveći relativni porast broja osoba s predijabetesom očekuje u zemljama s niskim dohotkom. Procjenjuje se da će ukupan broj osoba s IGT-om u zemljama s niskim dohotkom porasti za 130% do 2045. godine, u usporedbi s porastom od 38% u zemljama sa srednjim dohotkom i 8% u zemljama s visokim dohotkom. U slučaju IFG-a procjenjuje se porast prevalencije od 122% u zemljama s niskim dohotkom, 41% u zemljama sa srednjim i 6% u zemljama s visokim dohotkom (23, 26).

Prema podacima IDF-a za europsku regiju u 2024. godini, u skupini odraslih osoba od 20 do 79 godina, IGT imalo je oko 45,9 milijuna osoba (6,2 %), dok je IFG imalo oko 39,7 milijuna osoba (5,3%). Do 2050. godine predviđa se porast prevalencije IGT-a na 6,2 % te IFG-a na 5,7 %, Dodatno, procjenjuje se kako je u 2024. godini bilo oko 22 milijuna osoba koje boluju od šećerne bolesti međutim ista nije dijagnosticirana niti praćena od strane zdravstvenog sustava. S obzirom na visoku prevalenciju i velik broj oboljelih, predijabetes predstavlja značajan javnozdravstveni problem u europskoj regiji te važan čimbenik rizika za razvoj T2DM i njezinih komplikacija koje značajno opterećuju zdravstvene sustave, povećavaju troškove zdravstvene skrbi te negativno utječu na kvalitetu života i smrtnost stanovništva (26).

Prevalencija IGT-a i IFG-a slična je među muškarcima i ženama. IGT je češći u urbanim nego u ruralnim područjima, dok prevalencija IFG-a nije pokazivala razlike s obzirom na mjesto stanovanja (23). Poznato je kako je viša stopa urbanizacije povezana i s većom prevalencijom pretilosti i T2DM-a. Veći udio sjedilačkog načina života i prihvatanje „zapadnjačkih“

prehrambenih obrazaca može objasniti povezanost urbanizacije s lošijim cjelokupnim kardiometaboličkim zdravljem populacije (23, 27).

Brojne epidemiološke studije pokazuju da je prevalencija predijabetesa i rizik za razvoj T2DM-a viši u pojedinim rasnim i etničkim skupinama, uključujući osobe afričkog, američko-indijanskog, južnoazijskog i latinoameričkog podrijetla, u usporedbi s bijelom populacijom. (11, 28).

Na učestalost predijabetesa utječe složena kombinacija čimbenika kao što su očekivani životni vijek, socioekonomski status, dostupnost zdravstvenih usluga, razina obrazovanja, izloženost bolestima i javnozdravstvenim kampanjama te regionalna stopa pretilosti (29, 30). Daljnjom urbanizacijom populacije diljem svijeta postaju imućnije, imaju bolji pristup raznovrsnijoj prehrani, zdravstvenoj skrbi i obrazovanju te dulje žive. Budući daljnji razvoj najčešće podrazumijeva i modifikaciju tradicionalnog u „zapadnjački“ stil života očekuje se daljnji porast globalne prevalencije predijabetesa, prije svega u slabije razvijenim zemljama i zemljama u razvoju (11).

1.3. Probir i dugoročni ishodi bolesnika s predijabetesom

Probir na predijabetes i T2DM preporučuje se provoditi na temelju procjene čimbenika rizika ili primjenom validiranih kalkulatora rizika, osobito u asimptomatskih odraslih osoba s prekomjernom tjelesnom masom (ITM između 25 i 30 kg/m²) ili pretilošću (ITM > 30 kg/m²) koje imaju dodatne čimbenike rizika. Među najvažnijima su pozitivna obiteljska anamneza, arterijska hipertenzija, dislipidemija, kardiovaskularna bolest, sindrom policističnih jajnika, tjelesna neaktivnost te stanja povezana s inzulinskom rezistencijom. U osoba bez navedenih čimbenika rizika probir se preporučuje započeti u dobi od 35 godina, uz ponavljanje najmanje svake tri godine ako su nalazi uredni, odnosno češće u slučaju promjene rizičnog profila. Za probir se mogu koristiti mjerenja IGT-a, IFG-a ili HbA1c. U djece i adolescenata probir se razmatra nakon početka puberteta ili nakon navršene desete godine života u prisutnosti prekomjerne tjelesne mase ili pretilosti te dodatnih čimbenika rizika, dok posebnu pozornost zahtijevaju osobe iz visokorizičnih skupina, uključujući one s gestacijskim dijabetesom u anamnezi, HIV infekcijom ili izloženošću lijekovima (npr. terapija glukokortikoidima) koji povećavaju rizik za poremećaje glikemije (1).

U kliničkoj praksi razvijeni su brojni bodovni sustavi za procjenu rizika razvoja poremećaja metabolizma glukoze, među kojima je jedan od najčešće korištenih Finski bodovni sustav (engl. *Finnish Diabetes Risk Score*, FINDRISC). Spomenuti upitnik validiran je u više zemalja te se pokazao pouzdanim alatom za probir i prepoznavanje osoba s povećanim desetogodišnjim rizikom za razvoj predijabetesa i T2DM-a. Riječ je o jednostavnom, brzom i lako primjenjivom alatu u svakodnevnoj kliničkoj praksi koji procjenjuje rizik na temelju nekoliko čimbenika, uključujući dob, ITM, razinu tjelesne aktivnosti, unos voća i povrća, anamnezu arterijske hipertenzije, prethodno utvrđenu hiperglikemiju te obiteljsku anamnezu šećerne bolesti. Na temelju ostvarenog broja bodova ispitanici se svrstavaju u pet kategorija rizika za razvoj T2DM-a tijekom sljedećih deset godina: nizak, blago povišen, umjeren, visok i vrlo visok rizik (31-33).

Recentna meta-analiza *Richtera i sur.* pokazala je da je kumulativna incidencija T2DM-a tijekom petogodišnjeg razdoblja iznosila 39 % u osoba s IGT-om te između 18 % (prema kriterijima ADA-e) i 26 % (prema kriterijima WHO-a) u osoba s IFG-om. Ista studija također je pokazala da je prisutnost IGT-a i IFG-a, ovisno o primijenjenim dijagnostičkim kriterijima, povezana s četiri do pet puta većim rizikom od razvoja T2DM-a u usporedbi sa stanjem normoglikemije (34). Rizik progresije razlikuje se među pojedinim fenotipskim oblicima

predijabetesa. Najveća incidencija zabilježena je u osoba s kombiniranim IFG-om i IGT-om, zatim u onih s izoliranim IGT-om, dok izolirani IFG nosi najmanji rizik progresije u T2DM, bez značajnih geografskih razlika u navedenim obrascima (34).

Velika multicentrična studija na razini Europske Unije „IMI DIRECT“ (engl. *Innovative Medicines Initiative - Diabetes Research on Patient Stratification Consortium*), pokazala je da osobe koje ispunjavaju dva od triju (bilo koja dva od IFG, IGT ili povišenih vrijednosti HbA1c) dijagnostičkih kriterija za poremećaj glukoregulacije imaju višu stopu napredovanja prema T2DM-u od osoba koje ispunjavaju samo jedan kriterij, dok je u osoba koje ispunjavaju sva tri kriterija ta stopa još viša (35).

U kliničkom razmatranju dugoročnih ishoda u bolesnika s predijabetesom, važno je istaknuti da regresija glikemije u referentne (normoglikemijske) vrijednosti predstavlja klinički značajan ishod, budući je povezan sa smanjenim rizikom od razvoja T2DM-a i pojave kroničnih mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija (36). Više prospektivnih kohortnih studija pokazalo je da se u značajnog udjela bolesnika s predijabetesom u periodu praćenja ponovno uspostavlja normoglikemija, pri čemu su stope regresije na normalne vrijednosti glikemije često čak i veće od stopa progresije prema T2DM-u (37, 38). Iako se općenito u značajnom udjelu osoba s predijabetesom ostvaruje regresija u stanje normoglikemije, udio pojedinaca u kojih vrijednosti glukoze ostaju u dijagnostičkim kriterijima za predijabetes znatno varira među različitim populacijama (39, 40).

Dijagnoza predijabetesa definirana prema IFG-u ili IGT-u, ali ne prema HbA1c, povezana je s povećanim rizikom od smrtnosti od svih uzroka u rasponu od 8 do 25% u odnosu na kontrole. Ova se razlika može djelomično objasniti ograničenim brojem istraživanja koja koriste HbA1c kao kriterij za postavljanje dijagnoze predijabetesa, te činjenicom da povišene vrijednosti HbA1c vjerojatno predstavljaju manje precizan indikator hiperglikemije u osoba s blago povišenim razinama glukoze, nego što je to slučaj kod osoba s manifestnim T2DM (41, 42). Za usporedbu, nedavne studije pokazale su da je rizik od smrtnosti od svih uzroka u osoba s T2DM-om bio između 60 i 100% veći u odnosu na osobe bez dijabetesa (41). Ukupna veličina učinka bila je veća za predijabetes definiran prema IGT-u nego za predijabetes definiran prema IFG-u ili prema HbA1c, što upućuje na potencijalno veću vrijednost OGTT-a u identifikaciji bolesnika s predijabetesom s visokim rizikom (42).

Predijabetes definiran prema kriterijima IFG-a, IGT-a ili HbA1c također je pokazao pozitivnu povezanost s rizikom od kardiovaskularne smrtnosti te s pojavom različitih

kardiovaskularnih ishoda, uključujući koronarnu bolest srca, moždani udar, srčano zatajenje i fibrilaciju atriya (42).

Meta-analize opservacijskih studija pokazale su da bolesnici srednje životne dobi s predijabetesom imaju povećan rizik od aterosklerotskih kardiovaskularnih bolesti (engl. *Atherosclerotic cardiovascular disease*, ASCVD) i srčanog zatajenja, neovisno o progresiji poremećaja metabolizma glukoze u manifestni T2DM (43, 44).

Predijabetes se često pojavljuje udružen s nizom metaboličkih i kardiovaskularnih čimbenika rizika, uključujući pretilost, arterijsku hipertenziju, dislipidemiju, inzulinsku rezistenciju, oštećenu bubrežnu funkciju, albuminuriju, steatotičku bolest jetre povezanu s metaboličkim poremećajem (engl. *Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease*, MASLD), ishemijsku bolest srca i kronično srčano zatajenje. Visoka stopa pridruženih brojnih komorbiditeta u osoba s predijabetesom značajno povećava rizik za razvoj kroničnih bolesti i stopu prijevremenog mortaliteta (45).

Dokazi za jasnu povezanost predijabetesa s klasičnim dijabetičkim mikrovaskularnim komplikacijama, osobito retinopatijom višeg stupnja, manje su konzistentni nego za manifestni T2DM (46, 47). S druge strane, sve je više dokaza koji upućuju na veću učestalost perifernih (48, 49) i autonomnih (50) neuropatskih promjena već u fazi predijabetesa.

Također je utvrđena povećana incidencija nekoliko vrsta malignih bolesti u osoba s predijabetesom, primjerice rak jetre, hepatocelularni karcinom i rak dojke (42). U bolesnika s predijabetesom postoji veći rizik od razvoja demencije (uključujući demenciju svih uzroka, Alzheimerovu i vaskularnu demenciju) u odnosu na osobe bez poremećaja metabolizma glukoze (51). Nasuprot tome, nije utvrđena značajna povezanost između predijabetesa i kognitivnog oštećenja ili depresivnih simptoma, iako su za osobe s T2DM-om zabilježeni povećani rizici za razvoj oba navedena stanja (52, 53). Moguće je da je za razvoj depresivnih simptoma ili kliničke depresije potrebna izraženija hiperglikemija od one koja se uočava u bolesnika s predijabetesom, dok su razlike u podacima koji se odnose na demenciju i kognitivno oštećenje složenije za tumačenje. Ipak, valja napomenuti da su dostupne meta-analize temeljene na ograničenom broju primarnih studija (42).

Snaga povezanosti između predijabetesa i različitih kliničkih ishoda značajno varira ovisno o korištenom alatu (test) za postavljanje dijagnoze predijabetesa, pri čemu se najjače povezanosti uočavaju za predijabetes definiran prema vrijednostima HbA1c (između 5,7 i 6,4 %), dok su najslabije povezanosti zabilježene za predijabetes definiran prema vrijednostima glukoze natašte između 5,6 i 6,9 mmol/L (54). Definicija predijabetesa prema ADA-inim

kriterijima, koja se temelji na IFG-u, pokazuje visoku osjetljivost te obuhvaća veći udio populacije (prevalencija oko 56 %). Nasuprot tome, predijabetes definiran isključivo prema vrijednosti HbA1c pokazuje veću specifičnost, obuhvaća manji broj osoba (prevalencija je oko 18 %), ali one imaju veći rizik od nepovoljnih ishoda (55). Dijagnosticiranje predijabetesa temeljeno na vrijednostima HbA1c pokazalo je jaču povezanost s pojavom komplikacija, a povećani rizik za razvoj komplikacija u tako definiranoj populaciji neovisan je o naknadnoj progresiji u T2DM (56).

Rezultati 30-godišnjeg praćenja pokazali su da intervencije usmjerene na promjenu životnog stila u osoba s poremećenim metabolizmom glukoze značajno odgađaju razvoj T2DM-a. Uz smanjenje incidencije bolesti, zabilježeno je i značajno smanjenje učestalosti kardiovaskularnih događaja, mikrovaskularnih komplikacija te kardiovaskularne i ukupne smrtnosti. Sudionici koji su bili uključeni u intervencijske programe imali su i dulji očekivani životni vijek u usporedbi s kontrolnom skupinom. Dobiveni rezultati potvrđuju da dugoročne koristi promjena životnog stila nadilaze samu kontrolu glikemije te uključuju smanjenje najvažnijih komplikacija T2DM-a i poboljšanje ukupnog preživljenja. Navedeni nalazi pružaju snažnu potporu daljnjoj provedbi i širenju preventivnih programa temeljenih na promicanju zdravih životnih navika, osobito među osobama s predijabetesom i visokim rizikom za razvoj T2DM-a (40).

1.4. Etiologija i patofiziologija predijabetesa

Visoka, ali nepotpuna podudarnost T2DM-a među jednojajčanim blizancima upućuje na snažnu ulogu nasljednih čimbenika, dok nepotpuna konkordancija potvrđuje važnost okolišnih i epigenetskih čimbenika (57). U skladu s tim zapažanjima, brojne genetske studije identificirale su različite genske lokuse povezane s funkcijom β -stanica gušterače, skeletnih mišića i masnog tkiva (58, 59). Međutim, do sada poznate specifične genetske varijante objašnjavaju manje od 20% ukupnog rizika za razvoj T2DM-a (60).

Različiti demografski čimbenici, poput dobi, spola, etničke pripadnosti i porijekla mogu doprinijeti povećanom riziku za razvoj predijabetesa (61). Nadalje, brojni okolišni čimbenici i način života mogu potaknuti progresiju od normoglikemije prema predijabetesu i T2DM-u, pri čemu rano dijagnosticiranje i intervencija dokazano mogu modificirati taj tijek (62). Osim toga, intestinalna disbioza – abnormalni sastav crijevne mikrobiote – modificira otpuštanje kratkolančanih slobodnih masnih kiselina, proteina, vitamina i žučnih kiselina u cirkulaciju, što također može pridonijeti razvoju inzulinske rezistencije, odnosno razvoju predijabetesa i progresiji u T2DM (63).

Inicijalne promjene u razvoju inzulinske rezistencije ogledaju su u promjenama sastava masnog tkiva – dolazi do infiltracije makrofaga u masno tkivo što doprinosi njegovoj disfunkciji. Disfunkcionalno masno tkivo karakterizira razvoj lokalne upale, inzulinska rezistencija i narušena lipogeneza, pri čemu prevladava lučenje neesterificiranih masnih kiselina (engl. *Non-esterified fatty acids / Free fatty acids, NEFA / FFA*) i pro-upalnih adipokina u odnosu na lučenje anti-upalnih, inzulinsenzibilizirajućih, adipokina (64). Smanjenje cirkulirajućih razina adiponektina, adipokina kojeg fiziološki proizvodi zrelo potkožno masno tkivo, koje je prisutno desetljećima prije postavljanja dijagnoze T2DM-a, dodatno doprinosi disfunkciji masnog tkiva u početnim stadijima disregulacije metabolizma glukoze (65). S vremenom, ove promjene dovode do razvoja sistemske inzulinske rezistencije, (supkliničke) tinjajuće upale niskog stupnja i ektopične akumulacije lipida, karakterizirane visceralnom adipoznošću i MASLD-om (64).

U fiziološkim uvjetima, normalne razine glikemije postižu se ravnotežom između ulaska glukoze u krvotok i njezina unosa u stanice. Regulacija glikemije i inzulinskog signaliziranja uključuje precizno usklađenu hormonsku mrežu koja fiziološki održava homeostazu glukoze. Povećanje koncentracije glukoze u plazmi potiče izlučivanje inzulina iz β -stanica gušterače te istodobno inhibira lučenje glukagona iz α -stanica. Inzulin potiče unos glukoze u stanice, osobito

u stanice skeletnog mišića i masnog tkiva, povećanjem sinteze i translokacije transportera glukoze tipa 4 (engl. *Glucose Transporter Type 4*, GLUT4) – najvažnijeg transportera za unos glukoze u stanice perifernih tkiva. Istodobno smanjuje endogenu proizvodnju glukoze u jetri inhibicijom glukoneogeneze i stimulacijom sinteze glikogena (64).

Tijekom razdoblja gladovanja razina glikemije održava se smanjenim lučenjem inzulina, čime se ograničava unos glukoze u skeletne mišiće i masno tkivo. Ovakvo smanjenje perifernog iskorištavanja glukoze, u kombinaciji s povišenim koncentracijama glukagona iz α -stanica gušterače (jedan od primarnih okidača za pojačano lučenje glukagona je hipoglikemija), u početku potiče glikogenolizu u jetri, a zatim i glukoneogenezu, odnosno sintezu glukoze iz ne-ugljikohidratnih prekursora. Neka istraživanja ističu i važnu ulogu povećane lipolize u masnom tkivu, koja je posljedica hipoinzulinemije i pojačanog lučenja glukokortikoida kao odgovor na hipoglikemiju. Ovaj proces rezultira porastom koncentracije NEFA, koje alosterički stimuliraju glukoneogenezu, te glicerola, koji služi kao izravni supstrat za sintezu glukoze u jetri (64).

Na molekularnoj razini, vezanje molekule inzulina na njegov receptor pokreće kaskadni slijed u kojem fosforilacija proteina inzulinskog receptor-substrata (engl. *Insulin receptor substrate*, IRS) 1 aktivira fosfatidilinozitol 3-kinazu (PI3K). Taj enzim je katalizator u procesu stvaranja fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfata (PIP3), na način da fosforilizira fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat (PIP2), što dovodi do aktivacije protein kinaze B (PKB) i posljedičnih metaboličkih učinaka. Aktivirana PKB inhibira djelovanje proteina kinaze sintaze glikogena (engl. *Glycogen synthase kinase 3 alpha/beta*, GSK3 α/β), čime se uklanja inhibicija sintaze glikogena i potiče sinteza glikogena iz glukoza-6-fosfata. Promitogeni učinci inzulina u vidu rasta, proliferacije i diferencijacije stanica uglavnom su posredovani putem drugog sustava unutarstaničnih singalnih molekula – tirozin kinaze nazvane protein homologan Src-u i kolagenu (engl. *Src homology and collagen adaptor protein*, SHC) i aktivacije signalnog puta Ras (engl. *Rat sarcoma*) – MAPK (mitogen aktivirana protein kinaza) – ERK (ekstracelularnim signalom regulirana kinaza). Inzulinska rezistencija prvenstveno utječe na unutarstaničnu signalizaciju ovisnu o PI3K putu (64, 66, 67).

U predijabetesu dolazi do postupnog porasta razine glikemije unatoč povećanoj sekreciji inzulina u uvjetima inzulinske rezistencije. U tom kontekstu, u bolesnika s predijabetesom česta je nedostatna sekrecija inzulina u fazi brzog inzulinskog odgovora, uz povećanu sekreciju inzulina u kasnijoj fazi kako bi nadvladale raniju hiperglikemiju. Ovaj pretjerani stimulans β -

stanica postupno dovodi do njihove dekompenzacije i progresije stupnja hiperglikemije (68, 69).

Nekoliko kohortnih studija koje su uključivale ispitanike s poremećajem metabolizma glukoze utvrdilo je kako su osobe koje kasnije nisu razvile T2DM pokazivale samo postupni pad inzulinske osjetljivosti ciljnih perifernih tkiva uz očuvanu funkciju β -stanica gušterače, dok su osobe koje su razvile T2DM imale značajno smanjenu inzulinsku osjetljivost znatno ranije u odnosu na vrijeme postavljanja dijagnoze dijabetesa. Ovo smanjenje osjetljivosti ciljnih perifernih tkiva na inzulin pratilo je kontinuirano povećanje glikemije natašte i glikemije u OGTT-u, iako unutar normoglikemijskog raspona (70, 71, 72). U velikoj kohortnoj studiji „UK Whitehall II“ koja je uključivala bolesnike s predijabetesom, otprilike 6 godina prije postavljanja dijagnoze T2DM-a zabilježen je nagli porast glikemije u OGTT-u, nakon čega je, otprilike 2 godine prije postavljanja dijagnoze, uslijedio sličan nagli porast glikemije natašte (70).

Odražavajući relativne uloge inzulinske rezistencije i disfunkcije β -stanica, različiti su modeli korišteni za objašnjenje disfunkcije β -stanica u predijabetesu i T2DM-u. Najšire prihvaćeni model pretpostavlja da postoji kompenzatorna (sekundarna) hiperinzulinemija kao odgovor na pretilost i inzulinsku rezistenciju povezanu s pretilošću, koja, u prisutnosti nepovoljnih genskih varijanti u genima uključenima u biologiju β -stanica gušterače i sekreciju inzulina, dovodi do razvoja predijabetesa i T2DM-a. Alternativni pristup sugerira da je primarni poremećaj hiperinzulinemija, uzrokovana prekomjernom stimulacijom od strane okolišnih i genetskih čimbenika, pri čemu pretilost i inzulinska rezistencija nastaju sekundarno, a razvoj T2DM-a slijedi nakon iscrpljivanja fizioloških rezervi β -stanica gušterače. Konačno, primarna disfunkcija β -stanica, koja dovodi do (relativne) hipoinzulinemije, može uzrokovati povišene razine cirkulirajuće glukoze i NEFA, uz inzulinsku rezistenciju ili bez nje (73). Ovaj model može pomoći u objašnjenju klastera bolesnika s dijagnozom predijabetesa i T2DM-a povezanih s nedostatkom inzulina (74, 75).

Ovisno o primarno zahvaćenom ciljnom tkivu razlikuju se dva osnovna fenotipa inzulinske rezistencije - IFG i IGT (2). Kod izoliranog IFG-a, povećanje koncentracije glukoze na tašte posljedica je povećane endogene (jetrene) proizvodnje glukoze, koja je uzrokovana jetrenom inzulinskom rezistencijom i prekomjernim otpuštanjem NEFA iz masnog tkiva. Jetrena inzulinska rezistencija uključuje oštećenje supresije glukoneogeneze i oštećenje stimulacije sinteze glikogena. Povišena dostupnost NEFA na staničnoj razini alosterički aktivira glukoneogenezu, dok glicerol služi kao supstrat za *de novo* sintezu glukoze, dodatno

povećavajući glukoneogenezu i proizvodnju glukoze (64). U jetri, kao i u drugim tkivima osjetljivim na inzulin, NEFA stimuliraju β -oksidaciju, povećavaju oksidativni stres, potiču ektopičnu pohranu triglicerida, aktiviraju ceramidom inducirane upalne putove (67, 76) i inhibiraju inzulinsko unutarstanično signaliziranje, što dodatno doprinosi razvoju jetrene inzulinske rezistencije (66, 67, 76, 77).

Kod izoliranog IGT-a, povećanje postprandijalne glikemije (što se u dijagnostičkim testovima otkriva ponajprije kao abnormalna vrijednost glikemije dva sata nakon oralnog opterećenja glukozom u OGTT-u) primarno je posljedica oštećenog perifernog iskorištavanja glukoze, prvenstveno u skeletnim mišićima, uz umjerene promjene u jetrenoj inzulinskoj osjetljivosti, zajedno s oštećenjem i rane i kasne faze sekrecije inzulina (2, 35). Ova inzulinska rezistencija skeletnih mišića karakterizirana je smanjenim (inzulinom) potpomognutim transportom glukoze, fosforilacijom i skladištenjem glikogena. Osim rijetkih mutacija u inzulinskom signalnom putu, stanična inzulinska rezistencija prvenstveno je posljedica lipidnih metabolita NEFA, poput specifičnih diacilglicerola i ceramida, koji imaju lipotoksično djelovanje. Međutim, određene aminokiseline (posebno razgranatih lanaca) i čak sama glukoza (glukotoksičnost) također mogu inhibirati inzulinsko signaliziranje (66, 67, 76, 77). Važno je napomenuti da povećana apsorpcija glukoze u crijevima (68) i narušena fiziološka sekrecija inkretina uz smanjenu prandijalnu sekreciju inzulina (78), doprinose postprandijalnim oscilacijama glukoze.

Tijekom napredovanja predijabetesa, drugi patofiziološki mehanizmi kronične inzulinske rezistencije uključuju glukotoksičnost, abnormalnu funkciju mitohondrija i poremećenu međutkivnu komunikaciju, što kulminira u supkliničnoj sustavnoj upali uz povećano lučenje visoko osjetljivog C-reaktivnog proteina i drugih pro-upalnih citokina (npr. interleukina 6 (IL-6) i tumor-nekrotizirajućeg faktora (TNF), koji mogu inhibirati inzulinski signalni put i ometati proksimalnu transdukciju inzulinskog signala, doprinoseći razvoju inzulinske rezistencije (2, 67, 76, 77).

Zanimljivo je da, usprkos dobro poznatom učinku agonista receptora za glukagonu sličan peptid (engl. *Glucagon-like peptide*) 1 i inzulinotropni polipeptid ovisan o glukози (engl. *Glucose-dependent insulintropic polypeptide*, GIP) na snižavanje glikemije, u predijabetesu i T2DM-u nisu utvrđene značajnije promjene cirkulirajućih koncentracija ovih crijevnih peptida (2). Ipak, treba spomenuti i da postoje istraživanja koja govore o nižim odgovorima plazmatskih razina GLP-1 nakon opterećenja glukozom u osoba s kombiniranim IGT-om i IFG-om, u

usporedbi s osobama s normalnom tolerancijom glukoze, izoliranim IFG-om ili izoliranim IGT-om (79).

1.5. Terapijski pristup u osoba s predijabetesom

Primarni cilj u liječenju predijabetesa jest odgoditi ili spriječiti razvoj T2DM-a (2). U liječenju predijabetesa čvrsti dokazi proizlaze iz studija koje su ispitivale učinke promjene životnog stila i farmakoloških intervencija, međutim učinci intervencija promjene životnog stila uvelike ovise o fenotipu predijabetesa. Brojna istraživanja pokazala su da konvencionalne intervencije promjene životnog stila usporavaju progresiju u T2DM ili čak dovode do regresije u stanje normoglikemije u osoba s IGT-om, bez obzira na prisutnost istodobno i IFG-a, dok u osoba s izoliranim IFG-om učinci nisu bili statistički značajni (19, 80-82).

Meta-analize randomiziranih kontroliranih studija koje su ispitivale učinke intervencija promjena životnog stila u bolesnika s predijabetesom pokazale su da su ispitanici kod kojih su provedene takve intervencije imali između 35 i 47% nižu incidenciju razvoja T2DM-a u usporedbi s kontrolnim skupinama (19, 83-86). Najučinkovitiji pristupi promjeni životnog stila u prevenciji predijabetesa i razvoja T2DM-a uključuju povećanje razine tjelesne aktivnosti, poboljšanje kvalitete prehrane — primjerice smanjenje unosa masti i povećanje unosa vlakana — te poticanje gubitka tjelesne mase u osoba s prekomjernom tjelesnom masom ili pretilošću (83, 86). Intenzivnije intervencije dovode do većeg smanjenja rizika razvoja T2DM-a; takvi programi obuhvaćaju učestalije praćenje ispitanika, dulje trajanje pojedinog susreta ispitanika i istraživača, individualizirano savjetovanje i edukaciju te aktivno sudjelovanje osposobljenih stručnjaka u provedbi programa (83). Intervencije promjene životnog stila naročito su korisne u određenim podskupinama u bolesnika s predijabetesom. Različita istraživanja ukazuju na veće smanjenje rizika progresije u T2DM u starijih osoba (>50 godina) u odnosu na mlađe sudionike, kao i u osoba s pretilošću u usporedbi s onima normalne ili prekomjerne tjelesne mase (36, 87).

Iako su intervencije promjene životnog stila učinkovito smanjivale rizik progresije u T2DM u osoba s izoliranim IGT-om, nije uočena jasno izražena korist u populaciji s izoliranim IFG-om (19). Objašnjenje relativnog nedostatka odgovora na intenzivne intervencije promjene životnog stila kod osoba s izoliranim IFG-om nije potpuno jasno i može biti povezano s razlikama u patofiziologiji različitih fenotipa predijabetesa. Dok osobe s IGT-om imaju izraženu inzulinsku rezistenciju u mišićima uz samo blagu jetrenu inzulinsku rezistenciju, osobe s IFG-om pokazuju tešku inzulinsku rezistenciju jetre, uz smanjenu supresiju glikogenolize te smanjenu učinkovitost sinteze glikogena, uz normalnu ili gotovo normalnu osjetljivost skeletnih mišića na inzulin (88). Mnoge osobe s izoliranim IFG-om također

pokazuju obilježja metaboličkog sindroma s inzulinskom rezistencijom, što je povezano s povećanim ektopičnim masnim tkivom, osobito nakupljanjem masnog tkiva u jetri. U takvih bolesnika može biti potrebno strože kalorijsko ograničenje kako bi se postiglo smanjenje tjelesne mase i usporila progresija IFG-a u T2DM (89). S druge strane, izolirani IGT izraženije je povezan s inzulinskom rezistencijom u skeletnim mišićima, uz smanjenu funkciju β -stanica gušterače (88, 90). Stoga, tjelovježba za smanjenje inzulinske rezistencije mišića i primjena metformina koji primarno smanjuje jetrenu glukoneogenezu mogu biti učinkovitiji u osoba s IGT-om nego u osoba s IFG-om (88).

Od ranije su poznate razlike u dobnim i spolnim profilima osoba s IFG-om i IGT-om (88). Iako postoji jasna povezanost između dobi i povećane učestalosti IGT-a, učestalost IFG-a bila je slična u svim dobnim skupinama (23). S obzirom na veću zdravstvenu osviještenost kod starijih osoba, osobe s IGT-om vjerojatnije će se pridržavati i pozitivno reagirati na savjete o promjeni životnog stila (2). U pojedinaca s IFG-om često je dostatno poticanje na usvajanje zdravih životnih navika uz istovremenu kontrolu ostalih rizičnih čimbenika, osobito povišenog krvnog tlaka, radi smanjenja kardiovaskularnog rizika. Stoga bi OGTT trebao biti korišten u probiru osoba s IGT-om za uključivanje u strukturirane programe prevencije T2DM-a, dok su potrebna daljnja istraživanja za identifikaciju učinkovitih intervencija koje pouzdano usporavaju progresiju IFG-a u T2DM (2).

Sveukupno, dostupni dokazi sugeriraju da promjena životnog stila ima najveću korist u starijih osoba, osoba s pretilošću te onih u kojih je predijabetes karakteriziran prvenstveno razvojem IGT-om (91).

Intervencije promjene životnog stila također su proučavane zbog njihove uloge u induciranju regresije u stanje normoglikemije u osoba s predijabetesom. U literaturi se koristi više definicija regresije u normoglikemiju – uključujući postizanje razina glukoze natašte $<5,6$ ili $<6,1$ mmol/L, i/ili vrijednosti glukoze dva sata nakon opterećenja glukozom u OGTT-u $<7,8$ mmol/L, i/ili HbA1c $<5,7$ % na kraju intervencije. Meta-analize ukazuju da sudjelovanje u programima usmjerenima na prehranu i tjelesnu aktivnost povećava vjerojatnost regresije u normoglikemiju u usporedbi s kontrolnim skupinama (36). Randomizirane kontrolirane studije također su pokazale da sudionici koji su sudjelovali u intervencijama promjene životnog stila i u kojih je zabilježena regresija u stanje normoglikemije imaju nižu incidenciju T2DM-a i manju učestalost mikrovaskularnih komplikacija u usporedbi s onima u kojih i dalje perzistira poremećaj metabolizma glukoze (92, 93).

Iako su neke studije pokazale povoljne učinke farmakoterapije u prevenciji progresije predijabetesa u T2DM, treba imati na umu da predijabetes nije univerzalno prepoznat kao bolest. U tom kontekstu farmakološke i kirurške intervencije u mnogim zemljama nisu odobrene, a njihova isplativost predmet je brojnih farmakoekonomskih rasprava (2).

Iako je dokazano da metformin usporava progresiju predijabetesa u T2DM, Agencija za hranu i lijekove SAD-a (engl. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) nije odobrila njegovu primjenu u kliničkoj praksi. Trenutno se metformin koristi izvan indikacije („*off-label*“) u SAD-u i brojnim drugim zemljama za ovu namjenu (94). U studijama „US-DPP“ (engl. *United States Diabetes Prevention Program*) i „DPPOS“ (engl. *Diabetes Prevention Program Outcomes Study*) učinkovitost metformina bila je veća u osoba s ITM ≥ 35 kg/m², u osoba s IGT-om uz IFG, u osoba mlađih od 45 godina, te u žena s prethodnim gestacijskim dijabetesom (95,96). Sukladno tome, ADA u svojim smjernicama preporučuje razmotriti primjenu metformina za prevenciju T2DM-a u odraslih osoba s visokim rizikom, uključujući osobe s ITM > 35 kg/m², povišenom glikemijom natašte ($\geq 6,0$ mmol/l), povišenim HbA1c ($\geq 6,0$ %) te s anamnezom gestacijskog dijabetesa (97). Metformin i dalje ostaje jeftin i široko dostupan lijek za prevenciju razvoja T2DM-a u bolesnike s predijabetesom u kojih postoji navedeni rizični čimbenici (98).

U skupini tiazolidindiona, troglitazon je korišten u sklopu rane intervencije u bolesnika s predijabetesom i pokazao se učinkovit u prevenciji razvoja T2DM-a; međutim, njegova primjena je prekinuta prije kraja studije zbog hepatotoksičnih učinaka (99). Nadalje, studije su pokazale kako je pioglitazon potencijalno koristan u očuvanju funkciju β -stanica gušterače, slično kao što je uočeno kod troglitazona. Nadalje, pioglitazon je povezan s nižom učestalošću razvoja T2DM-a i većom stopom regresije u stanje normoglikemije u usporedbi s placebo, poglavito u osoba s IGT-om, međutim kao nuspojava se ističe povećanje tjelesne mase (100, 101). S druge strane, u „BPRP“ (engl. *Beijing Prediabetes Reversion Program*) studiji, pioglitazon nije pokazao razliku u usporedbi s promjenama životnog stila u stopi regresije u stanje normoglikemije, što upućuje na moguće međuetničke razlike u odgovorima na liječenje lijekovima iz ove skupine (102). Još jedan predstavnik iz skupine tiazolidindiona, rosiglitazon, je povezan s nižom učestalošću progresije predijabetesa u T2DM neovisno o tome jesu li pacijenti imali izolirani IFG, IGT, ili oba poremećaja metabolizma glukoze (103).

U jednom kliničkom istraživanju, u skupini bolesnika s predijabetesom koja je primala akarbozu zabilježena je značajno niža stopa razvoja T2DM-a u usporedbi s kontrolnom skupinom (104). Nadalje, rezultati drugog istraživanja demonstrirali su da terapija akarbozom

nije samo smanjila rizik za razvoj T2DM-a, već je i doprinijela povećanju stope regresije u stanje normoglikemiju u osoba s IGT-om (105).

Učinak inhibitora natrij-glukoznog kotransportera (engl. *Sodium-glucose co-transporter inhibitors*, SGLT2i) 2 u osoba s predijabetesom obuhvaća smanjenje rizika od razvoja T2DM-a, redukciju tjelesne mase uz ostvarivanje dobro poznatih renoprotektivnih i kardioprotektivnih učinaka. Posebice su značajni benefiti u bolesnika s postojećim kardio-renalnim komorbiditetima. Dosadašnji klinički podaci ukazuju na poboljšanje glikemijskih parametara i smanjenu incidenciju mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija. Međutim, usprkos ovim nalazima, a s obzirom na broj studija i snagu dokaza, postoji potreba za daljnjim istraživanjima i razvojem strukturiranih smjernica za kliničku primjenu SGLT2i u osoba s predijabetesom (106).

Rezultati velikih randomiziranih kontroliranih istraživanja pokazali su da agonisti GLP-1 receptora, poput liraglutida i semaglutida, uz značajan gubitak tjelesne mase učinkovito usporavaju progresiju predijabetesa u T2DM te povećavaju vjerojatnost regresije u stanje normoglikemije. U velikoj studiji koja je ispitala učinke liraglutida u bolesnika s pretilošću, primjena liraglutida rezultirala je značajnim poboljšanjem glikemijskih parametara, uključujući smanjenje HbA_{1c}, glukoze natašte te inzulinske rezistencije, uz povišenje razine C-peptida, u usporedbi s placebom. Ovi pozitivni učinci doveli su do niže prevalencije predijabetesa i smanjene stope razvoja T2DM-a u pretilih ispitanika (107). U studiji koja je ispitala učinak semaglutida na mršavljenje u odraslih osoba s prekomjernom tjelesnom masom ili pretilošću, gotovo polovica ispitanika je inicijalno zadovoljavala kriterije za postavljanje dijagnoze predijabetesa. Među tim ispitanicima, u 84% ispitanika koji su primali semaglutid zabilježena je regresija u stanje normoglikemije i sniženje vrijednosti HbA_{1c}, u odnosu na 48% ispitanika u kontrolnoj skupini (108).

U istraživanju u kojem se ispitivao učinak tirzepatida, dualnog agonista GIP i GLP-1 receptora u odraslih osoba s prekomjernom tjelesnom masom ili pretilošću, nakon 3 godine praćenja u skupini bolesnika s predijabetesom, stopa razvoja T2DM-a bila je značajno niža u skupini ispitanika koji su primali tirzepatid u usporedbi s kontrolnom skupinom. Također, regresija u stanje normoglikemije bila je učestalija u skupini ispitanika liječenih tirzepatidom (109).

U sustavnom pregledu Wang i sur. razmatrali su učinke agonista GLP-1 receptora u osam randomiziranih kontroliranih istraživanja (šest studija s liraglutidom, jedna sa eksenatidom i jedna sa semaglutidom). Sve studije uključivale su osobe s predijabetesom

(prema HbA1c ili IGT-u u OGTT-u). Pet od tih studija pokazalo je da agonisti GLP-1 receptora značajno povećavaju vjerojatnost regresije u stanje normoglikemiju u usporedbi s placebom. U tri studije, ispitanici koji su primali agoniste GLP-1 receptora imali su manju vjerojatnost razvoja T2DM-a nego ispitanici u kontrolnoj skupini (110). Unatoč ohrabrujućim rezultatima potvrđenima u randomiziranim kontroliranim studijama, učinak na gubitak tjelesne mase nestaje nakon prestanka liječenja. S obzirom na visoke troškove, isplativost primjene agonista GLP-1 receptora, dualnih GLP1 – GIP receptor agonista i drugih lijekova protiv pretilosti u prevenciji progresije predijabetesa u T2DM i dalje je predmet rasprave u znanstvenih krugovima (111).

Empirijsko nadomještanje vitamina D može pomoći u smanjenju rizika od razvoja T2DM-a u odraslih osoba s predijabetesom. Nadalje, prema rezultatima *Pittasa i sur.* primjena suplementacije vitamina D povećava i vjerojatnost regresije u stanje normoglikemije za 30% u usporedbi s kontrolnom skupinom (112).

Trenutno je barijatska kirurgija najučinkovitiji način liječenja pretilosti i često se razmatra u bolesnika koji odbijaju ili zbog raznih razloga nisu kandidati za farmakoterapiju. U osoba s predijabetesom (temeljenom na vrijednosti HbA1c) u kojih je primijenjeno kirurško liječenje pretilosti, sukladno studiji *Borges-Canha i sur.* postojala je značajna stopa regresije u stanje normoglikemije – 82% ispitanika nakon jedne godine praćenja, te 66% ispitanika nakon tri godine praćenja. U trećoj godini praćenja, veća stopa remisija zabilježena je u muškaraca, u ispitanika mlađe životne dobi, te u ispitanika u kojih je provedena operacija „gastric sleeve“ u usporedbi s operacijom „Roux-en-Y“ želučane premosnice (113). S druge strane, kada se detaljnije gledaju parametri glukoregulacije, u ispitanika s predijabetesom u kojih je provedena operacija Roux-en-Y želučane premosnice došlo je do značajnog pada razine inzulina natašte, smanjenja HbA1c te poboljšanja indeksa inzulinske rezistencije HOMA-IR (engl. *Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance*), što je zabilježeno i dvije godine nakon provedenog zahvata (114).

Sumarno, dostupni dokazi i trenutne kliničke smjernice uglavnom preporučuju promjene životnog stila u odnosu na farmakoterapiju kao primarni pristup u liječenju osoba s predijabetesom. Sustavni pregled literature *Mousavija i sur.* pokazao je da je pristup temeljen na promjeni životnom stilu učinkovitiji u odnosu na primjenu metformina, smanjujući učestalost razvoja T2DM-a za dodatnih 25% u odnosu na isključivo metformin (115). Nadalje, meta-analiza u sklopu sustavnog pregleda *Hawa i sur.* pokazala je da učinci promjena životnog stila traju dulje od učinaka lijekova; nakon prosječno 7,2 godine od završetka intervencije, u

skupini ispitanika u kojih su provođene promjene životnog stila rizika od progresije u T2DM bio je manji za 28%, dok učinci farmakoterapije nestaju ili značajno slabe nakon prekida primjene lijeka (116).

Iako farmakološke intervencije mogu biti učinkovite u smanjenju rizika od progresije predijabetesa u šećernu bolest tipa 2, njihova primjena često je povezana s dodatnim financijskim opterećenjem za bolesnike i zdravstvene sustave. Osim toga, kao i svaki oblik farmakološkog liječenja, mogu biti praćene pojavom nuspojava različitog intenziteta, što može utjecati na suradljivost bolesnika i dugoročnu uspješnost liječenja. Nasuprot tome, intervencije usmjerene na promjenu životnih navika, uključujući zdravu prehranu, povećanje tjelesne aktivnosti i smanjenje tjelesne mase, povezane su s minimalnim rizikom od štetnih učinaka te istodobno donose brojne dodatne zdravstvene koristi. Zbog povoljnog omjera učinkovitosti i sigurnosti te ograničenih dokaza koji podupiru rutinsku farmakoterapiju u svih osoba s predijabetesom, farmakološko liječenje nije prihvaćeno kao standardni pristup u svim zemljama, pri čemu se promjena životnog stila i dalje smatra temeljnom strategijom prevencije šećerne bolesti tipa 2. Unatoč sve većem interesu za primjenu farmakoterapije u osoba s predijabetesom, rezultati kliničkih i farmakoekonomskih analiza upućuju na potrebu pažljive procjene omjera koristi i troškova takvog pristupa, zbog čega aktualne kliničke smjernice i dalje promjenu životnog stila preporučuju kao primarnu strategiju liječenja (117, 118).

1.6. Krajnji produkti glikacije

Prvi dokaz o nastanku krajnjih produkata glikacije (engl. *Advanced glycation end products*, AGEs) iznio je Louis Maillard početkom 20. stoljeća, opisavši neenzimske reakcije glikacije koje su temelj tamnjenja namirnica tijekom kuhanja i obrade – izlaganja visokim temperaturama. Neenzimske reakcije između terminalnih amino skupina aminokiselina ili bočnih amino skupina lizina i arginina u proteinima te karbonilnih skupina redukcijskih šećera (npr. glukoze, riboze i trioza) dovode do stvaranja Schiffovih baza. Pod povećanim oksidativnim stresom te se baze dalje oksidiraju i preoblikuju u vrlo reaktivne 1,2-dikarbonilne spojeve. Ti 1,2-dikarbonilni spojevi potom reagiraju s amino skupinama proteina, stvarajući međumolekulske i unutarmolekulske poprečne veze. Složeni niz reakcija koji vodi do nastanka ovih spojeva obično se naziva i Maillardovim reakcijama. Proteini povezani takvim poprečnim vezama — uključujući receptorske proteine i enzime — gube svoju normalnu fiziološku funkciju. Takve modifikacije proteina u ljudskog organizmu i završni produkti koji nastaju njihovom razgradnjom zajednički se nazivaju krajnji produkti uznapredovale glikacije – AGEs. (119,120).

Glavni egzogeni izvori AGEs-a obuhvaćaju termički obrađene namirnice bogate proteinima, lipidima i/ili šećerima, kao i spojeve nastale pušenjem cigareta. Unatoč studijama koje su pokazale porast razina AGEs-a u plazmi nakon konzumacije hrane bogate ovim spojevima, intestinalna apsorpcija AGEs-a, kao i njihov unos putem plućnih alveola, imaju tek manji značaj. Samo oko 10% AGEs-a unesenim prehranom se apsorbira iz crijeva, od čega se jedna trećina izlučuje urinom unutar 48 sati. Ipak, dokazano je da egzogeni AGEs-i posjeduju proinflamatorne i prooksidativne učinke, a dijetetsko ograničenje unosa hrane bogate AGEs-ima povezano je sa značajnim smanjenjem upalnih procesa (121-123). Čimbenici koji utječu na sadržaj AGEs-a u hrani ovise o sadržaju proteina, masti i šećera te o vrstama primijenjenih metoda obrade i kuhanja, pretežno o temperaturi i trajanju pripreme. Dulje izlaganje visokim temperaturama, kao što su one koje se koriste u obradi mliječnih i mesnih proizvoda i tehnikama kuhanja poput pečenja i prženja, povećava proizvodnju AGEs-a u hrani (124).

Postoji rasprava o relativnoj važnosti AGEs-a u određenim vrstama hrane, s obzirom na ograničenu probavu i apsorpciju putem gastrointestinalnog trakta, osobito AGEs-a visoke molekularne težine, dok se čini da bubrezi učinkovito izlučuju AGEs-e niske molekularne težine koji se nalaze u hrani. Unatoč tome, smanjeni unos egzogenih AGEs-a prehranom povezan je sa smanjenjem upale i poboljšanjem vaskularne funkcije u određenim skupinama

bolesnika, primjerice u ljudi s kroničnim bubrežnim zatajenjem (125). Međutim, nasuprot tome, postoje studije koje nisu pokazale značajne učinke kratkotrajne konzumacije „low-AGEs“ dijeta na upalne i kardiovaskularne profile rizika u osoba s prekomjernom tjelesnom masom (126).

Tek šest desetljeća nakon inicijalnih Maillardovih zapažanja uslijedila je identifikacija AGEs-a *in vivo*. Naime, hiperglikemija može inducirati glikaciju različitih strukturnih i funkcionalnih proteina, uključujući proteine plazme i kolagen. Neenzimska modifikacija proteina plazme, poput albumina, fibrinogena i globulina, može rezultirati raznim štetnim učincima, obuhvaćajući promjene u vezanju lijekova u plazmi, aktivaciju trombocita, stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *Reactive oxygen species*, ROS), narušen proces fibrinolize te poremećaj u regulaciji imunološkog sustava. S druge strane, strukturno oštećenje kolagena mijenja diferencijaciju osteoblasta, što posljedično dovodi do pregradnje kostiju i krhkosti skeleta. Stvaranje AGEs-a tada je prepoznato kao sastavni dio normalnog procesa starenja, najizražnije u tkivima koja sadrže dugovječne proteine, poput kolagena u izvanstaničnom matriksu, kristalina očne leće i proteina bazalne membrane bubrega (127, 128).

U fiziološkim uvjetima uspostavljena je ravnoteža između prooksidativnih i antioksidativnih sustava. Međutim, tijekom procesa starenja navedena se ravnoteža pomiče prema prooksidativnim faktorima, što rezultira povišenom razinom ROS-a i posljedičnom pojačanom oksidacijom proteina, lipida i nukleinskih kiselina. Iako se oštećeni proteini uobičajeno razgrađuju djelovanjem 20S proteasoma unutar ubikvitin-proteasomskog sustava, AGEs-i mogu inhibirati njegovu aktivnost zbog svoje strukturne kompleksnosti. Ova inhibicija dovodi do akumulacije oksidiranih i oštećenih proteina, što potiče njihovu daljnju modifikaciju. Štoviše, povećane razine ROS-a ubrzavaju nastanak AGEs-a, a povišene koncentracije AGEs-a rezultiraju promjenama u izvanstaničnim proteinima poput kolagena i elastina, te aktiviraju specifične unutarstanične signalne puteve (123).

Većina AGEs-a nije strukturno karakterizirana te se detektiraju po karakterističnoj fluorescenciji (129). Nakupljanje AGEs-a može se neinvazivno procijeniti mjerenjem autofluorescencije u tkivu kože (engl. *Skin autofluorescence*, SAF) (130). SAF je validirana neinvazivna metoda koja korelira s akumulacijom određenih fluorescentnih AGEs-a u koži, ali ne predstavlja izravno mjerenje svih AGEs spojeva (131). SAF se povećava s godinama i povišen je kod osoba s T2DM-om u usporedbi sa zdravim osobama iste dobi (132, 133). Nadalje, od ranije je poznato kako je stupanj akumulacije AGEs-a povezan s progresijom T2DM-a i ubrzanim razvojem pridruženih kroničnih komplikacija poput retinopatije i neuropatije (134, 135).

Receptori za AGEs (engl. *Receptor for advanced glycation end-products*, RAGEs) pripadaju klasi transmembranskih, multifunkcionalnih proteina iz superobitelji imunoglobulina. RAGEs se pojavljuju u nekoliko izoformi, a općenito sadrže ekstracelularne V, C1 i C2 domene, transmembranski segment i citoplazmatsku domenu. Na RAGEs se vežu brojni endogeni ligandi — uključujući AGEs-e — putem svojih ekstracelularnih i citoplazmatskih domena (136). Vezanje liganda na ekstracelularne domene pokreće kaskadu unutarstaničnih signalnih događaja koja dovodi do povećanog stvaranja ROS-a i upalnih citokina, što rezultira proliferacijom stanica, apoptozom i daljnjom up-regulacijom RAGEs-a. Ekstracelularna domena RAGEs-a veže AGEs-e, a ta interakcija pokreće prijenos signala aktivacijom različitih kinaza, poput mitogen-aktiviranih protein kinaza (MAPK), Janus kinaze (JAK) i fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3K). To dovodi do daljnje aktivacije nizvodnih putova, uključujući prekomjernu ekspresiju nuklearnog transkripcijskog faktora kappa B (engl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF- κ B) — transkripcijskog faktora koji inducira ekspresiju proupalnih gena i pospješuje stvaranje upalnih citokina (IL-1, IL-6 i TNF- α). Posljedica je povećan oksidativni stres (povišena proizvodnja ROS-a i reaktivnih dušikovih spojeva) te inducirana stanična apoptoza (136-138).

AGEs-i mogu stvarati poprečne veze između proteina u stijenkama krvnih žila, što dovodi do povećane krutosti krvnih žila i posljedično povišenog arterijskog tlaka (139,140). AGEs-i moduliraju inicijalne korake u aterogenezi pokrećući upalno-proliferativni proces. Interakcija AGEs-a s endotelnim stanicama, kao i s ostalim staničnim elementima nakupljenim unutar aterosklerotskog plaka, poput mononuklearnih fagocita i stanica glatkih mišića, jedan je od mehanizama koji dovode do endotelne disfunkcije. Specifično, interakcija AGEs-a s komponentama stijenke krvne žile povećava vaskularnu permeabilnost, ekspresiju prokoagulantnih endotelnih molekula te proizvodnju ROS-a, što rezultira povišenom endotelnom ekspresijom adhezijskih molekula leukocita - glikoproteina smještenih na površini endotelnih stanica koji posreduju u adheziji leukocita na stijenke krvnih žila i njihovoj migraciji u tkiva tijekom upalnih procesa ili ozljeda. Sve navedeno doprinosi napredovanju ateroskleroze i doprinosi disfunkciji endotela krvnih žila (141).

AGEs-i mogu doprinijeti patofiziološkim procesima u sklopu T2DM-a poticanjem kronične upale i oksidativnog stresa (142). Kronična upala niskog stupnja povezana s pretilošću može biti jedna od mehanicističkih veza između AGEs-a i razvoja inzulinske rezistencije (143, 144). Upala potiče inzulinsku rezistenciju moduliranjem unutarstaničnih putova, koji interfiriraju sa unutarstaničnim glasnicima u putu djelovanja inzulina. Poznato je kako

aktivacija c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) narušava signalizaciju inzulina poticanjem fosforilacije supstrata inzulinskog receptora (145). Slično tome, pokazano je da aktivacija signalnog puta inhibitora κ B kinaze/nuklearnog faktora κ B (IKK/NF- κ B) inhibira signalizaciju inzulina (146). Osim upale, aktivacija osi AGEs-RAGEs također potiče stvaranje ROS-a, koji je povezan s razvojem inzulinske rezistencije (147). U skeletnim mišićima, tkivu ključnom za kontrolu homeostaze glukoze, AGEs-i smanjuju ekspresiju GLUT4 receptora i potiču aktivaciju proupalnih putova (148).

AGEs-i također mogu utjecati na funkciju β -stanica gušterače povećanjem upale i oksidativnog stresa, čime dodatno doprinose stanju hiperglikemije (149,150). AGEs-i imaju citotoksični učinak na β -stanice i induciraju apoptozu, proces koji je dodatno ubrzan povećanom proizvodnjom ROS-a. Studije koje su koristile primarne β -stanice i stanične linije pokazuju da inhibicija RAGEs-a ili antioksidativni tretman sprječavaju toksični učinak induciran AGEs-ima (151). Nadalje, pokazano je da AGEs-i ometaju izlučivanje inzulina iz β -stanica izravnim utjecajem na transkripcijske čimbenike mehanizmom koji ovisi o inhibiciji faktora PDX1 (engl. *pancreatic and duodenal homeobox 1*) induciranoj FOXO-1 (engl. *Forkhead box protein O-1*) (152).

AGEs-i, osim dobro poznate uloge u promicanju inzulinske rezistencije, također imaju ulogu u patofiziologiji pretilosti, što je naznačeno njihovom sposobnošću da induciraju povećanje tjelesne mase u odraslih (153). Obzirom na središnju ulogu inzulina u reguliranju energetske ravnoteže, smatra se da je inzulinska rezistencija jedan od ključnih mehanizama kojima AGEs-i ometaju kontrolu energetske ravnoteže u hipotalamusu (154, 155). Drugim riječima, smanjena osjetljivost na inzulin može biti način na koji AGEs-i utječu na funkcioniranje hipotalamusa u regulaciji unosa energije.

Uz to, AGEs-i mogu aktivirati i proupalne signalne putove, kao što su JNK i IKK/NF- κ B, koji su povezani s inzulinskom i leptinskom rezistencijom u hipotalamusu, do koje dolazi zbog prehrane bogate mastima, što posljedično dovodi do disfunkcije hipotalamusa. Dakle, upala predstavlja još jedan mogući mehanizam putem kojeg AGEs-i narušavaju energetska ravnotežu, što rezultira povećanjem tjelesne mase (156-158).

1.7. Endokanabinoidni sustav

Naziv "kanabinoidi" obuhvaća spojeve koji se nalaze u biljci *Cannabis Sativa*, iz porodice konopljovki (lat. *Cannabaceae*) jednoj od prvih kultiviranih biljaka uopće. Povijest uporabe ove biljke duboko je isprepletena s poviješću čovječanstva, uz brojne arheološke i paleobotaničke dokaze koji potvrđuju prisutnost i uporabu konoplje unatrag više od jedanaest tisuća godina u Središnjoj Aziji. Od samih početaka široka rasprostranjenost ove biljke vezana je uz migracije nomadskih naroda prvenstveno zbog primjene u dobivanju vlakana za užad, tekstila i papira, te kao izvor hrane i ulja. Rani zapisi iz drevne Kine, Indije, Egipta, Grčke i Rimskog Carstva, ukazuju na medicinsku primjenu ove biljke kroz povijest. Kanabis, biljka iz iste porodice, ali s većim udjelom psihoaktivnog tetrahidrokanabinola (THC) od konoplje, se koristio u raznim kulturama diljem svijeta za ublažavanje boli, naročito reumatske, ublažavanje simptoma upale, mučnine, tjeskobe, poboljšanje apetita i sna, kao anestetik i u liječenju depresije. Ove raznolike primjene svjedoče o dugoj tradiciji medicinske primjene preparata ove biljke znatno prije modernih znanstvenih otkrića. Ključna prekretnica u znanstvenom razumijevanju učinaka ove biljke dogodila se 1964. godine, kada su izraelski znanstvenici *Raphael Mechoulam* i *Yehiel Gaoni* identificirali i strukturirali THC, glavni psihoaktivni fitokanabinoid. Glavni i najistraživaniji fitokanabinoidi su Δ^9 -tetrahidrokanabinol (Δ^9 -THC) i kanabidiol (CBD). Spoj Δ^9 -THC nalazi se u visokom udjelu u kanabisu i odgovoran je za njegova psihoaktivna, ali i intoksicirajuća svojstva – nakon konzumacije izaziva osjećaj relaksacije i euforije, uz inhibiciju odnosno izmjenu psihomotornih i kognitivnih procesa. Taj obrazac učinaka predstavlja osnovu za zlouporabu u okviru rekreacijskih droga (hašiš i marihuana). S druge strane, spoj CBD, za koji se dugo smatralo da uopće nema psihoaktivne učinke, prikladno je nazvati „neintoksicirajući“ fitokanabinoid, budući se ipak pokazalo da može modulirati simptome nekolicine neuropsihijatrijskih oboljenja. Otkriće i detaljnije karakteriziranje učinaka THC-a poslužilo je kao temelj za daljnja istraživanja novog endogenog sustava, danas poznatog kao endokanabinoidni sustav (engl. *Endocannabinoid system*, ECS). Godine 1988. godine američki farmakolog *William A. Devane* i suradnici karakterizirali su prvi kanabinoidni receptor (CB₁R) u mozgu štakora, a zatim je 1993. godine karakteriziran i drugi endokanabinoidni receptor, CB₂R, koji se nalazi uglavnom na krvnim stanicama i imunološkim tkivima (159-165).

Nakon otkrića receptora putem kojih ECS ostvaruje većinu svojih učinaka, istraživane su endogene tvari koje bi mogle djelovati kao ligandi i aktivirati navedene receptore. Endogeni

agonisti kanabinoidnih receptora tada su klasificirani kao "endokanabinoidi" (eCB) (166). Prvi identificirani endogeni ligand kanabinoidnih receptora dobio je ime anandamid, izvedeno od sanskrske (sanskrt – drevni indijski jezik) riječi "*Ananda*" koja označava "radost, blaženstvo, užitak". Taj spoj, kemijskog naziva arahidonoiletanolamid (AEA), otkriven je 1992. godine (167). Nedugo zatim, otkriven je i drugi endokanabinoid, 2-arahidonoilglicerol (2-AG) (168). Osim navedenih, u skupinu endokanabinoida ubrajaju se i spojevi kao što su 2-arahidonilgliceril eter (noladin eter), N-arahidonoildopamin te O-arahidonoiletanolamin (virodhamin) (166). Potječu od lipida izvedenih iz arahidonske kiseline vezanih za glicerol - diacilglicerol (DAG) ili amine (N-acil amidi) (169). Iako i AEA i 2-AG sadrže arahidonsku kiselinu (AA), njihovi putevi sinteze i razgradnje gotovo su potpuno različiti i posredovani su različitim enzimima (170).

AEA se uglavnom sintetizira iz membranskih lipida, kao što su fosfatidiletanolamin i fosfatidilkolin, koji se pomoću N-acil-transferaze (NAT) pretvaraju u N-acil-fosfatidiletanolamin (NAPE), iz kojeg se dalje proizvodi AEA pomoću N-arahidonoil-fosfatidiletanolamin fosfolipaze tipa D (NAPE-PLD). Razgradnja AEA odvija se pretežno hidrolizom pomoću amidne hidrolaze masnih kiselina (engl. *Fatty Acid Amide Hydrolase*, FAAH) 1, za koju je dokazano da hidrolizira AEA u AA i etanolamin (EtNH₂). S druge strane, 2-AG se uglavnom proizvodi hidrolizom fosfatidilinozitola pomoću fosfolipaze C (PLC) kako bi se stvorio DAG, koji se zatim kasnije pretvara u 2-AG pomoću α ili β DAG lipaza. Spoj 2-AG se brzo hidrolizira u masne kiseline, kao što je AA, i glicerol, pomoću nekoliko enzima, posebno serinske hidrolaze, monoacilglicerol lipaze (MAGL) (166, 170). Osim toga, 2-AG brzo degradiraju i drugi enzimi, uključujući citokrom P450, cikooksigenazu-2, lipoksigenazu te proteine s α/β hidrolaznim domenama ABHD6 i ABHD12 (171).

Razlikuju se tri klase receptora vezanih uz ECS:

- receptori spregnuti s G-proteinima (engl. *G protein-coupled receptors*, GPCR), kao što su CB₁R i CB₂R, GPCR18, GPCR55, GPCR119;
- nuklearni receptori, kao što su receptori aktivirani proliferatorom peroksisoma (engl. *The peroxisome proliferator-activated receptors*, PPAR);
- ionski kanali, kao što je prolazni receptorski potencijalni kationski kanal podfamilije V (engl. *Transient Receptor Potential Vanilloid*, TRPV) 1 i 2 (166).

Ligandna aktivacija CB₁R i CB₂R dovodi do inhibicije adenilat ciklaze i smanjenja stanične koncentracije cikličkog adenzin monofosfata (cAMP). Promjene u intracelularnoj razini cAMP-a utječu na proteinsku kinazu A (PKA) i posljedično na fosforilacijsko stanje niza

ciljnih proteina, što dovodi do značajnih promjena u staničnoj aktivnosti. cAMP modulira funkciju brojnih ionskih kanala, uključujući naponski ovisne K⁺ i Ca²⁺ kanale; stoga CB1R/CB2R posredovana signalizacija na neuronskoj razini utječe na električnu aktivnost neurona i otpuštanje neurotransmitera, te općenito na staničnu funkciju (172, 173). Osim toga, aktivacija ovih receptora ima i imunomodulatorni učinak. CB1R i CB2R izraženi su u ljudskim plućnim makrofagima, a njihova aktivacija inducira fosforilaciju kinaza ERK1/2 i povećanu proizvodnju ROS-a. Aktivacija kanabinoidnih receptora također selektivno inhibira otpuštanje angiogenih i limfangiogenih faktora, što može utjecati na makrofagima posredovano vaskularno preoblikovanje u tumoru te podržavati stanje kronične upale (174). Kanabinoidi također mogu aktivirati receptor-aktivirane proliferatore peroksisoma (PPAR), osobito izoforme PPAR α i PPAR δ , koje su obilato prisutne u oksidativnim tkivima i reguliraju gene povezane s transportom supstrata, oksidacijom i oksidativnom fosforilacijom. Nakon aktivacije, PPAR-i se translociraju u jezgru, heterodimeriziraju s retinoid X receptorom (engl. *Retinoid X Receptor - RXR*) i vežu se za element odgovora na aktivatore peroksisoma (engl. *Peroxisome Proliferator Response Element – PPRE*) kako bi regulirali transkripciju ciljnih gena (175).

Različita tkiva pokazuju različitu lokalizaciju ovih receptora. CB₁R jedan je od najbrojnijih GPCR-ova u središnjem živčanom sustavu, s najvećom koncentracijom u bazalnim ganglijima, malom mozgu, hipokampusu i korteksu velikog mozga. Prisutan je i u perifernom živčanom sustavu te u različitim perifernim organima (166, 176). Ova distribucija korelira s poznatim učincima kanabinoida, kao što su oštećenja kognitivnih funkcija, pamćenja, učenja i motoričke koordinacije. Osim toga, CB₁R je pronađen u različitim cirkulirajućim imunološkim stanicama. Iako u manjim količinama, CB₁R je prisutan i na periferiji, posebice u nadbubrežnoj žlijezdi, srcu, plućima, prostati, jetri, maternici, jajnicima, testisima, sjemenovodu, koštanoj srži, timusu i krajnicima (166, 177). Za razliku od CB₁R, CB₂R je u visokoj mjeri izražen u perifernim stanicama i organima povezanim s imunološkom funkcijom, uključujući makrofage, limfocite B, prirodne stanice ubojice (NK stanice), slezenu, krajnike i timus. Također je prisutan u gastrointestinalnom traktu, jetri, plućima i reproduktivnim organima (166, 178). Brojne studije ukazuju na imunološku ulogu CB₂R receptora, pri čemu aktivacija tog receptora eCB-ima može dovesti do supresije ili pojačane proizvodnje proupalnih tvari, ovisno o prirodi proupalnog podražaja i vrsti liganda (179). Članovi PPAR obitelji nuklearnih hormonskih receptora su transkripcijski faktori koji imaju ulogu u regulaciji metabolizma lipida, mitohondrijske biogeneze, energetske homeostaze i imunoloških funkcija. Studije su pokazale

da se eCB-i i lijekovi dizajnirani kao njihovi agonisti, mogu vezati na ove receptore i modulirati neuroinflamatorni i neurodegenerativni učinak (180, 181). Aktivacijom PPAR receptora, eCB-i utječu na različite fiziološke i patološke procese, uključujući metabolizam lipida, energetske ravnotežu, ponašanje vezano uz hranjenje, neuroprotekciju, epilepsiju, cirkadijalne ritmove, upalu, ovisnost i kognitivne funkcije (182). Utvrđeno je da AEA može aktivirati PPAR γ i na taj način potaknuti nizvodnu signalizaciju (183). PPAR α je pak visoko izražen u organima i tkivima koja imaju visoku stopu katabolizma masnih kiselina za proizvodnju energije, kao što su jetra, smeđe masno tkivo, endokrino tkivo, gastrointestinalni trakt, srčani mišić i skeletni mišić. U manjoj mjeri, PPAR α se također nalazi u bubrezima, nadbubrežnim žlijezdama, endotelnim stanicama i stanicama imunološkog sustava (184).

Djelovanje eCB-a je kompleksno zbog njihove lipofilne prirode i važne značajke da su njihovi prekursori prisutni u lipidnim membranama te se sintetiziraju prema potrebi. Štoviše, oni su nespecifični medijatori jer aktiviraju velik broj receptora i mogu se preklapati s drugim signalnim putovima i metaboličkim procesima. AEA se ponaša kao parcijalni agonist za CB $_1$ R i CB $_2$ R receptore, a također se veže za TRPV1 i GPR55. Budući da 2-AG može aktivirati CB $_1$ R i CB $_2$ R te pritom postići maksimalni učinak, okarakteriziran je kao puni agonist. Osim kanabinoidnih receptora, 2-AG modulira nuklearne receptore masnih kiselina - PPAR α i PPAR γ , GABA $_A$ receptor, adenoziński A3 receptor, TRPV1 i GPR55 (170).

Disregulacija ECS-a zabilježena je u stanjima kao što su pretilost i inzulinska rezistencija, djelujući kroz niz međusobno povezanih mehanizama. U podlozi ovih procesa najčešće se spominje pretjerana aktivacija ECS-a, koja je u pretilih osoba obilježena povišenim razinama eCB i aktivacijom odgovarajućih receptora u visceralnom masnom tkivu, skeletnim mišićima i jetri, što je povezano s nastankom inzulinske rezistencije. Ovi učinci posredovani su prvenstveno aktivacijom CB $_1$ R u ključnim metaboličkim tkivima: u jetri njihova stimulacija potiče lipogenezu i razvoj steatoze, u skeletnim mišićima smanjuje unos glukoze, dok u gušterači utječe na sekreciju inzulina iz β -stanica (185, 186). Ova situacija može biti pogoršana ukoliko stimulacija CB $_1$ R, a što je to pokazano u animalnim studijama, inhibira proizvodnju adiponektina, ključnog hormona koji povećava osjetljivost na inzulin i djeluje protuupalno (187, 188).

U masnim tkivima, neravnoteža između aktivnosti ECS-a u visceralnom i potkožnom masnom tkivu može dovesti do prekomjernog nakupljanja masnoća u visceralnim područjima. S obzirom na ulogu intra-abdominalne masnoće u razvijanju inzulinske rezistencije i aterogene upale, ovo stanje može poticati razvoj T2DM-a i ateroskleroze. PPAR- γ posreduje akumulaciju

masti u adipocitima kroz nekoliko kompleksnih molekularnih mehanizama. Prvo, aktivacija lipoprotein lipaze osigurava adipocitima egzogene masne kiseline za sintezu triacilglicerola, dok inhibicija adenilat ciklaze sprječava lipolizu i stimulira sintezu triacilglicerola. Dodatno, inhibicija 5'-AMP-aktivirane protein kinaze (AMPK) inhibira oksidaciju masnih kiselina, a pojačani unos glukoze omogućava stanicama dostupnost supstrata za sintezu *de novo* masnih kiselina putem sintaze masnih kiselina (FAS) te produkciju glicerola potrebnog za biosintezu triacilglicerola. Međutim, da bi se izbjegla pretjerana akumulacija lipida, ovi mehanizmi normalno su pod kontrolom autokrine regulacije u zrelim adipocitima. Leptin smanjuje razine eCB, PPAR- γ ostvaruje negativnu povratnu spregu na CB₁R i razine eCB-a (vjerojatno povećanjem ekspresije masne kiseline amidne hidrolaze – FAAH), dok PPAR- δ negativno regulira izražaj CB₁R. Inzulin također može smanjiti razine eCB, što se očituje povećanom FAAH ekspresijom i smanjenim plazmatskim razina eCB u stanju hiperinzulinemije. AEA aktivira TRPV1 kanale prisutne u pre-adipocitima koji inhibiraju adipogenezu, dok 2-AG, koji ne aktivira TRPV1, može imati drugačije uloge tijekom diferencijacije. Ta receptorska specifičnost objašnjava diferencijalnu regulaciju AEA i 2-AG tijekom adipogeneze (186).

Animalne studije upućuju na zaključak da u tkivima koja iskorištavaju glukozu endogene razine eCB mogu biti dovoljno visoke za tonsku aktivaciju CB₁R, ali ne CB₂R. Takva selektivna aktivacija smanjuje iskorištavanje glukoze u tim tkivima, što bi moglo biti povoljno za endokannabinoid-posredovani unos glukoze u adipocitima, namijenjenu *de novo* sintezi triacilglicerola. Ovi učinci eCB-a mogu proizlaziti iz smanjenja oslobađanja insulina iz beta stanica pankreasa, inhibicije insulinske osjetljivosti na razini ne-adipoznog tkiva koje koristi glukozu, ili kombinacije oba mehanizma. Na taj način, ECS može predstavljati važan metabolički regulator koji preusmjerava glukozni metabolizam prema akumulaciji energije u masnom tkivu, što ima značajne implikacije za razumijevanje metaboličke homeostatze i patogeneze metaboličkih poremećaja (186, 189).

Istraživanja provedena u posljednja dva desetljeća ukazala su na važnu ulogu ECS-a u razvoju pretilosti i njezinim štetnim učincima na metabolizam glukoze i lipida, čime može doprinosti razvoju insulinske rezistencije i T2DM-a (185). Unutar središnjeg živčanog sustava, aktivacija CB₁R pojačava unos hrane modulirajući aktivnost hipotalamičkih neurona i posljedično, otpuštanje oreksigenih i anoreksigenih neuropeptida. Nadalje, signalizacija preko CB₁R utječe na neuralne krugove nagrađivanja i pojačanja u mezolimbickom sustavu, što dovodi do preferiranja ukusne hrane. CB₁R je također prisutan u perifernim organima važnim za kontrolu metabolizma i aktivira anaboličke putove, pogodujući pohrani energije. U bijelim

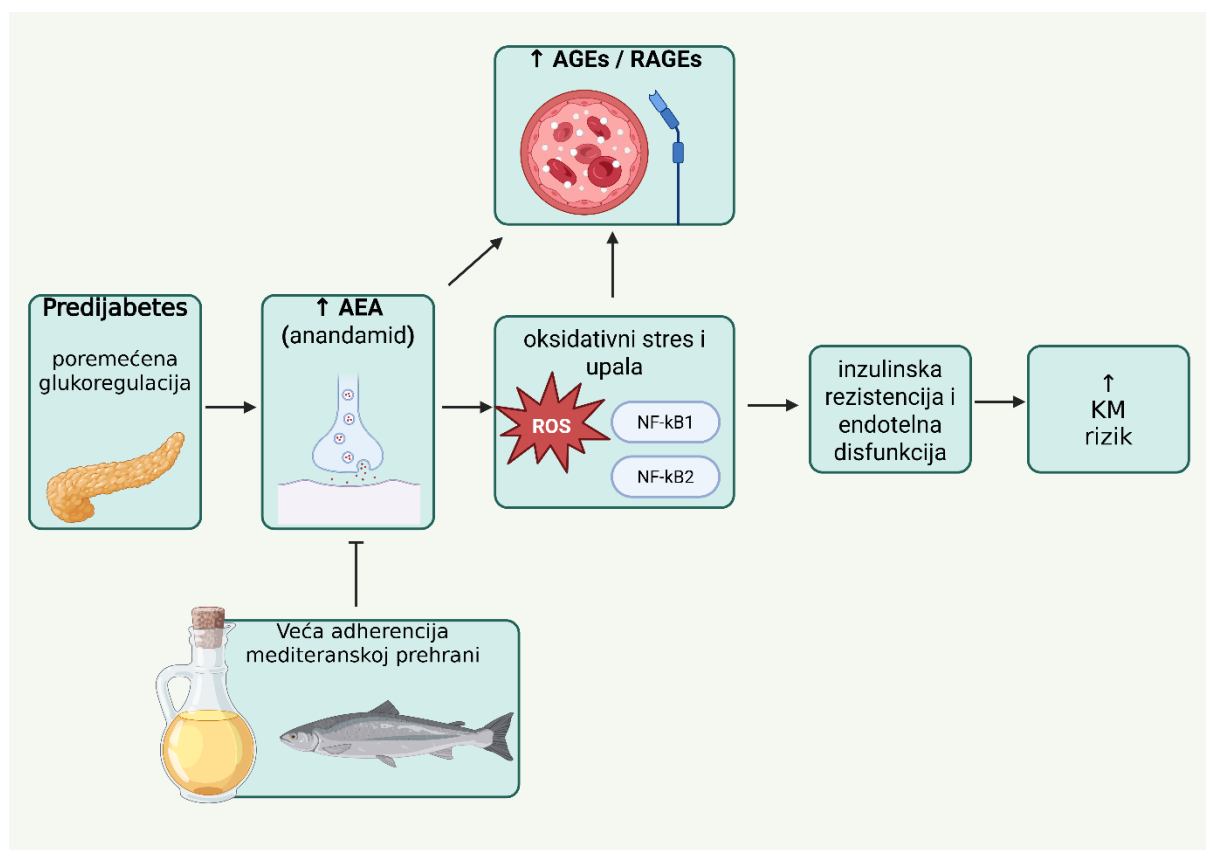
adipocitima, aktivacija CB₁R povećava *de novo* sintezu masnih kiselina, pojačava nakupljanje triglicerida i smanjuje lipolizu. Štoviše, CB₁R povećava jetrenu lipogenezu i potiče oksidativni metabolizam putem oslabljene mitohondrijske oksidativne fosforilacije u skeletnim mišićima (185, 190, 191). U abdominalnoj pretilosti, tonus ECS-a je općenito povišen u središnjem živčanom sustavu kao i u perifernim tkivima, što je indicirano visokim razinama eCB-a i/ili prekomjernom ekspresijom CB₁R. Točni temeljni mehanizmi nisu jasni; međutim, eCB-i su lipidni medijatori, a na njihovu biosintezu može izravno utjecati unos masti hranom. Ovaj hiperaktivni ECS može doprinijeti daljnjem nakupljanju masti pojačavajući unos hrane, kao i pogodujući lipogenezi i smanjujući potrošnju energije u perifernim organima (190, 192). S obzirom da je visceralna pretilost glavni odrednik inzulinske rezistencije, ne iznenađuje da prekomjerna aktivnost ECS-a pogoduje razvoju metaboličkih abnormalnosti povezanih s pretilošću (185).

U jetri aktivacija jetrenih CB₁R može smanjiti sustavnu osjetljivost na inzulin neovisno o tjelesnoj masi. Naime, miševi koji eksprimiraju CB₁R isključivo na hepatocitima ostaju mršavi kada se hrane prehranom bogatom mastima, ali razvijaju jetrenu i sistemska inzulinska rezistenciju, dok miševi sa specifičnom delecijom CB₁R u hepatocitima postaju pretili, ali ostaju osjetljivi na inzulin (193). Nekoliko mehanizama može biti u pozadini ovih nalaza: aktivacija jetrenih CB₁R smanjuje klirens inzulina smanjenjem jetrene ekspresije enzima koji razgrađuje inzulin te inhibira signalizaciju inzulina putem IRS1 i Akt2, što rezultira povećanom proizvodnjom glukoze u jetri prvenstveno zbog povećane glikogenolize (193). Nadalje, aktivacija CB₁R inducira stres endoplazmatskog retikuluma što rezultira povišenim jetrenim razinama ceramida dugog lanca koji zauzvrat inhibiraju signalizaciju inzulina (194). Sveukupno, ovi podaci pružaju snažne dokaze da poremećen tonus ECS-a, zbog stanja koja dovode do pretilosti, poput prehrane bogate mastima, može tada doprinijeti daljnjem nakupljanju masti i inzulinskoj rezistenciji putem prekomjerne aktivnosti CB₁R, te tako pogodovati razvoju T2DM-a (185). Relativno malo se zna o ulozi CB₂R u kontroli metaboličkih procesa; međutim, nedavne studije sugeriraju da CB₂R mogu utjecati na upalne aspekte pretilosti i T2DM-a. Agonisti CB₂R mogu pojačati upalu povezanu s pretilošću, inzulinsku rezistenciju i steatozu jetre (195).

Nedavne studije istražile su mogućnost da ECS može pogodovati razvoju T2DM-a inducirajući apoptozu β -stanica. Zucker-ovi dijabetički modeli (ZDF), štakori homozigoti za nefunkcionalne receptore leptina (ZDF/Gmi fa/fa), su vrijedan životinjski model jer razvijaju spontani dijabetes s progresijom i patofiziologijom sličnom humanom T2DM-u. Naime, mladi

ZDF štakori su otporni na inzulin uz stanje normoglikemije, dok stariji ZDF štakori razvijaju hiperglikemiju zbog progresivnog zatajenja β -stanica. U ovom modelu, ibipinabant, globalni antagonist CB_1R , usporava gubitak β -stanica neovisno o njegovim učincima na tjelesnu težinu (196). Nadalje, periferno ograničeni antagonist receptora CB_1 JD5037 odgađa progresiju T2DM-a i gubitak funkcije β -stanica, potvrđujući da EC djelujući kroz periferne CB_1R mogu doprinijeti disfunkciji β -stanica (197).

Kod ljudi, prekomjerna aktivacija ECS-a povezana je s povećanom proizvodnjom $TNF-\alpha$ u visceralnom masnom tkivu, što dodatno potencira aktivaciju ECS-a i podržava stanje kronične upale (186). Sveukupno, hiperaktivacija ECS-a pogoršava stanje inzulinske rezistencije i kronične upale niskog stupnja, čime se zatvara začarani krug koji povezuje pretilost, metabolički sindrom i progresiju metaboličkih poremećaja karakterističnih za predijabetes prema T2DM-u (185, 186). Utjecaj povišenih razina eCB u kontekstu oksidativnog stresa, kronične upale, te kardiometaboličkih učinaka, prikazan je na **Slici 2**.



Slika 2. Mogući mehanicistički slijed u kojem predijabetes i poremećena glukoregulacija, uz promjene u ECS-u i nakupljanje AGEs/RAGEs, potiču oksidativni stres i kroničnu upalu, što pridonosi inzulinskoj rezistenciji, endotelnoj disfunkciji i povećanom kardiometaboličkom riziku, dok veća adherencija mediteranskoj prehrani može modulirati razine anandamida. Kratice: AEA – anandamid; AGEs – krajnji produkti uznapredovale glikacije (engl. *Advanced glycation end products*); RAGEs – receptori za krajnje produkte uznapredovale glikacije (engl.

Advanced glycation end products receptors); ROS – reaktivni kisikovi spojevi (engl. *Reactive oxygen species*); KM – kardiometabolički. Napravljeno u <https://BioRender.com>.

Osim uloge u patofiziologiji metaboličkih poremećaja, prekomjerna aktivacija ECS-a, osobito preko CB₁R, može potaknuti oksidativni stres, upalu i smanjenu bioraspoloživost dušikova oksida, čime izravno pridonosi razvoju endotelne disfunkcije. Oštećen endotel zatim gubi vazoprotektivnu ulogu te potiče vazokonstrikciju, adheziju leukocita, trombozu i aterosklerotske promjene. Na taj se način pretjerana aktivacija ECS-a i endotelna disfunkcija međusobno povezuju u začarani krug koji pogoduje razvoju i progresiji kardiovaskularnih bolesti (198). Ipak, patološka hiperaktivacija ECS-a ne može se izjednačiti s učincima pojedinih kanabinoida, budući da je suplementacija CBD u randomiziranim kliničkim ispitivanjima pokazala povoljan učinak na sniženje arterijskog tlaka u bolesnika s arterijskom hipertenzijom (199, 200).

Klinička ispitivanja na pretilim pacijentima i pacijentima s T2DM-om dokazala su učinkovitost globalnog inverznog agonista CB₁R, rimonabanta, u smanjenju tjelesne mase i opsega struka te u poboljšanju kontrole lipida i glukoze. Na temelju ovih obećavajućih podataka, rimonabant je inicijalno licenciran u više od 50 zemalja diljem svijeta za liječenje pretilosti. Međutim, lijek je naknadno povučen s tržišta zbog povećanog rizika od psihijatrijskih nuspojava, poput anksioznosti, depresije i suicidalnih ideja, te je terapijski razvoj ove klase spojeva prekinut (201). U novije vrijeme, razvijeni su periferno ograničeni antagonisti CB₁R koji slabije prolaze kroz krvno-moždanu barijeru i stoga su lišeni centralno posredovanih psihijatrijskih nuspojava, kako bi se procijenilo zadržava li inhibicija perifernih CB₁R metaboličku korist globalne blokade CB₁R (185). Studija *Tama i sur.* pokazala je da je liječenje miševa s pretilošću izazvanom prehranom periferno ograničenim neutralnim antagonistom CB₁R AM6545 poboljšalo toleranciju glukoze, osjetljivost na inzulin, profil lipida u plazmi, iako je bio manje učinkovit od rimonabanta u smanjenju tjelesne mase i nije utjecao na kalorijski unos (202). Naknadne studije su pokazale da je vrlo potentan, selektivan, inverzni agonist CB₁R, JD5037, još učinkovitiji u poboljšanju metaboličkih parametara u modelima pretilosti/dijabetesa kod glodavaca i ima hipofagične učinke preokretanjem rezistencije na leptin (203), utječe na inzulinsku rezistenciju jetre izazvanu pretilošću (194) i poboljšava funkciju β -stanica u ZDF štakora (204).

1.8. Mediteranska dijeta

Mediteranska prehrana (engl. *Mediterranean diet*, MD), pojam koji je skovao američki fiziolog *Ancel Benjamin Keys* još sredinom 20. stoljeća (205), jedan je od najproučavanijih i najpoznatijih prehrambenih obrazaca u svijetu. Podrijetlo tradicionalnog obrasca MD-e dolazi iz civilizacija sa prostora koji okružuju Sredozemno more, tako da je ovaj obrazac usko povezan s društvenim ponašanjima i stilovima života stanovnika te regije (206). MD povijesno je povezana s niskom stopom kroničnih bolesti i visokom očekivanom životnom dobi odraslih (207).

Tradicionalni obrazac MD-e karakterizira:

- visok unos maslinovog ulja (posebno djevičanskog i ekstra djevičanskog maslinovog ulja) koji se koristi kao glavni izvor masti;
- umjeren unos mliječnih proizvoda (uglavnom sir i jogurt);
- visok unos hrane biljnog porijekla (voće, povrće, kruh i druge žitarice (minimalno rafinirane), krumpir, grah, orašasti plodovi i sjemenke);
- riba i perad u malim do umjerenim količinama;
- crveno meso u malim količinama;
- vino u umjerenim količinama, konzumirano uz obroke;
- općenito minimalno prerađena, sezonski svježa i lokalno uzgojena hrana;
- niska potrošnja mesnih prerađevina, slatkiša i mliječnih proizvoda koji sadrže visok udio masnoća (naročito zasićenih masnih kiselina) i dodanog šećera (206, 207, 208).

Jedna od prvih i najutjecajnijih epidemioloških studija koja je sustavno istražila povezanost prehrambenih navika, životnog stila i kardiovaskularnog rizika bila je Studija sedam zemalja, koju su u razdoblju od 1958. do 1983. godine proveli Ancel Keys i suradnici. Istraživanje je obuhvatilo približno 13 000 nasumično odabranih muškaraca srednje životne dobi, između 40 i 55 godina, iz Sjedinjenih Američkih Država, Japana, Italije, Grčke, Nizozemske, Finske i tadašnje Jugoslavije. Analizirani su prehrambeni i životni čimbenici te incidencija koronarne bolesti srca. Rezultati su pokazali da je u mediteranskim područjima, osobito u Grčkoj i južnoj Italiji, gdje je prehrana bila bogata povrćem, žitaricama, voćem, mahunarkama i ribom, učestalost koronarne bolesti srca bila znatno niža nego u zemljama poput Sjedinjenih Američkih Država i Finske. Iako je Keys isticao ključnu ulogu prehrane u nastanku koronarne bolesti srca, naglašavao je da prehrana ne djeluje izolirano. Stanovništvo

mediteranskih regija bilo je tjelesno aktivnije, njegovalo je snažnije obiteljske i društvene veze te živjelo sporijim i manje stresnim životnim ritmom. Stoga se niska učestalost kardiovaskularnih bolesti u tim područjima može pripisati sinergijskom djelovanju prehrambenih obrazaca i širih životnih navika, pri čemu je prehrana ipak prepoznata kao jedan od najvažnijih čimbenika (205, 209).

Od tada je objavljeno nekoliko prospektivnih kohortnih studija na tu temu. Jedna od najvećih studija bila je prospektivna kohortna studija „*Nurses' Health Study*“ koja je uključivala 74.886 žena koje su praćene u periodu od 20 godina. Ova je studija sugerira kako je veća adhezencija MD-i povezana s manjim rizikom od incidencije koronarne bolesti srca manjim rizikom od moždanog udara (210). Naknadna analiza navedenih podataka, u studiji *Sotos-Prieta i sur.*, koja je dodatno uključila i kohortu ispitanika muškog spola iz studije „*Health Professional Follow-up Study*“, pokazala je ukupni manji rizik od kardiovaskularnih bolesti tijekom dugogodišnjeg perioda praćenja, kako za žene tako i za muškarce (211). Štoviše, rezultati metaanaliza sugeriraju kako su osobe koje se hrane po principima MD-e, u usporedbi s kontrolnom prehranom, imale bolju kontrolu antropometrijskih, metaboličkih i upalnih parametara rizika. Konkretno, nedvojbeni su dokazi koji podupiru veću učinkovitost MD-e u smanjenju tjelesne težine, ITM i opsega struka, snižavanju ukupnog kolesterola, povećanju HDL-kolesterola i smanjenju razina upalnih parametara kao što su C-reaktivni protein (CRP) i interleukin 6 (IL-6), u usporedbi s kontrolnim dijetama (212).

U studiji „*MÉDITA*“, jednostruko centraliziranom randomiziranom ispitivanju, 215 muškaraca i žena s novodijagnosticiranim T2DM-om randomizirano je u dvije skupine: jedna skupina kod kojih je režim ishrane odgovarao obrascima MD-e te druga u kojoj je korištena prehranu s niskim ukupnim udjelom masti, uz ukupno praćenje od 8 godina. Tijekom tog razdoblja, primjena MD-e dovela je do povoljnih promjena u kontroli glikemije i faktorima rizika za koronarne bolesti te je odgodila potrebu za antidijabetičkom farmakoterapijom (213, 214).

Studija „*PREDIMED*“ (šp. „*Prevención con Dieta Mediterránea*“), uključivala je muškarce i žene srednje životne dobi bez anamneze kardiovaskularnih bolesti, ali su temeljem rizičnih čimbenika pripadali u skupinu s povišenim kardiovaskularnim rizikom. Kriteriji uključivanja obuhvaćali su prisutnost T2DM-a ili najmanje tri glavna čimbenika rizika povezana s razvojem metaboličkog sindroma, među kojima su bili pušenje, arterijska hipertenzija, povišene vrijednosti LDL-kolesterola, snižene vrijednosti HDL-kolesterola, prekomjerna tjelesna masa ili pretilost te pozitivna obiteljska anamneza koronarne bolesti srca.

Ispitanici su randomizirani u tri intervencijske skupine: skupinu koja se hranila mediteranskom prehranom obogaćenom ekstra djevičanskim maslinovim uljem, skupinu koja se hranila mediteranskom prehranom obogaćenom dnevnim unosom miješanih orašastih plodova te kontrolnu skupinu kojoj je preporučena prehrana s niskim udjelom masti. Tijekom intervencije nije bilo propisano ograničenje ukupnog energetskeg unosa, niti je dodatno poticana tjelesna aktivnost. Rezultati studije pokazali su da provođenja MD-e obogaćena ekstra djevičanskim maslinovim uljem ili orašastim plodovima u osoba s visokim kardiovaskularnim rizikom značajno smanjuje incidenciju velikih kardiovaskularnih događaja u usporedbi s kontrolnom prehranom (215).

Dokazi iz brojnih drugih prospektivnih studija upućuju na to da je veća adherencija MD-i obrnuto proporcionalna s rizikom od razvoja T2DM-a (216). U naknadnom izvješću studije „ATTICA“, koja je uključivala 3042 sudionika, srednja i visoka stopa, u usporedbi s niskom stopom pridržavanja MD-i, bili su povezani s nižom 10-godišnjom incidencijom postavljanja dijagnoze T2DM-a, uz značajno sniženje markera upalnih procesa te povećanjem ukupnog antioksidacijskog kapaciteta organizma (217). Dodatno, MD je povezana s boljom kontrolom glikemije među pacijentima s T2DM-om i predijabetesom u usporedbi s kontrolnim dijetama, uključujući i dijetu s nižim udjelom masti (218).

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

2.1. Glavni ciljevi istraživanja

1. Usporediti plazmatske koncentracije AEA i 2-AG u osoba s predijabetesom i zdravih kontrola.
2. Utvrditi povezanost koncentracija AEA i 2-AG s razinama akumulacije AGEs i pokazateljima kardiovaskularnog rizika u osoba s predijabetesom.
3. Procijeniti povezanost stupnja adhezije mediteranskoj prehrani s plazmatskim koncentracijama AEA i 2-AG u ukupnoj studijskoj populaciji.

2.2. Sporedni ciljevi istraživanja

1. Ispitati povezanost plazmatskih koncentracija AEA i 2-AG s antropometrijskim parametrima.
2. Analizirati povezanost plazmatskih koncentracija AEA i 2-AG s razinama glukoze natašte i lipidnim statusom.
3. Ispitati odnos plazmatskih koncentracija AEA i 2-AG s vrijednostima arterijskog tlaka.

2.3. Hipoteze istraživanja

1. Osobe s predijabetesom imaju više plazmatske koncentracije AEA i 2-AG u usporedbi sa zdravim kontrolama.
2. Postoji razlika u koncentracijama AEA i 2-AG između muškaraca i žena, kako u ukupnom uzorku ispitanika tako i u skupini osoba s predijabetesom.
3. Vrijednosti AEA i 2-AG razlikuju se unutar skupine osoba s predijabetesom ovisno o vrijednostima sistoličkog arterijskog tlaka i indeksa tjelesne mase.
4. Više plazmatske koncentracije AEA povezane su s većom akumulacijom AGEs i višom AGE Reader-procijenjenom kategorijom kardiovaskularnog rizika u osoba s predijabetesom.
5. Veća adhezija mediteranskoj prehrani povezana je s nižim plazmatskim koncentracijama AEA i 2-AG u ukupnoj studijskoj populaciji.

3. ISPITANICI I POSTUPCI

Istraživanje je osmišljeno u suradnji Centra za dijabetes, endokrinologiju i bolesti metabolizma Kliničkog bolničkog centra Split te Katedre za patofiziologiju Medicinskog fakulteta u Splitu, a provedeno je u Laboratoriju za kardiometabolička istraživanja na Medicinskom fakultetu u Splitu.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Splitu, 2. prosinca 2024. godine (Klasa: 029-01/24-02/0001; Ur.br.: 2181-198-03-04-24-0111) te je provedeno u skladu s etičkim načelima Helsinške deklaracije. Istraživači su svakog od ispitanika ponaosob temeljito upoznali s ciljevima i postupcima istraživanja, nakon čega je svaki sudionik dao svoj pisani pristanak za sudjelovanje.

Ovo istraživanje dizajnirano je kao presječna studija.

3.1. Ispitanici

Ispitanici su regrutirani preko Centra za dijabetes, endokrinologiju i bolesti metabolizma Kliničkog bolničkog centra Split. U istraživanju je sudjelovalo ukupno 178 osoba podijeljenih u dvije skupine, uključujući 92 pacijenta s dijagnosticiranim predijabetesom te 86 zdravih kontrolnih ispitanika, usklađenih prema dobi i spolu.

Kriterij uključenja u studiju bila je potvrđena dijagnoza predijabetesa, temeljem najnovijih preporuka Američkog dijabetičkog udruženja. Ti kriteriji uključuju:

- vrijednost glukoze natašte u rasponu od 5,6 do 6,9 mmol/L ili vrijednosti HbA_{1c} između 5,7 % i 6,4 %, ili razina glukoze u plazmi dva sata nakon oralnog opterećenja glukozom između 7,8 i 11,0 mmol/L (1).

Iz studije su isključeni ispitanici koji su zadovoljavali bilo koji od postavljenih kriterija isključenja:

- ranije postavljena dijagnoza dijabetesa tip 1 ili 2
- kronične bolesti srca, bubrega ili jetre
- anamneza infarkta miokarda ili ishemijskog moždanog udara
- bolest perifernih arterija
- sekundarna arterijsku hipertenziju
- aktivna maligna bolest
- akutna infekcija
- autoimuna bolest

- korištenje dodataka prehrani ili proizvoda s kanabisom (uključujući rekreativnu uporabu marihuane)
- aktualna terapija kortikosteroidima
- drugi poremećaji koji mogu značajno utjecati na glukoregulaciju, poput Cushingova sindroma, akromegalije ili feokromocitoma.

Jednak protokol uz identične kriterije isključenja primijenjen je i na ispitanike u kontrolnoj skupini. Za svakog ispitanika u kontrolnoj skupini određena je glukoze natašte, glukoza dva sata nakon oralnog opterećenja glukozom te HbA1c kako bi isključili mogućnost postojanja poremećaja metabolizma glukoze.

3.2. Postupci

Tijekom inicijalnog pregleda, za svakog su sudionika prikupljeni klinički podaci kroz detaljnu anamnezu i pregled medicinske dokumentacije.

Tjelesna masa i visina mjerene su korištenjem kalibrirane vage s integriranim stadiometrom (Seca, Birmingham, UK). Na temelju tih vrijednosti izračunat je ITM kao omjer tjelesne mase i kvadrata visine (izražen u kg/m^2). Opseg struka i opseg bokova izmjeren je mjernom vrpcom s točnošću od 0,1 cm – opseg struk mjereno je na sredini između vrha zdjelične kosti (lat. *crista iliaca*) i donjeg ruba rebra, dok je opseg bokova određen na najširem dijelu glutealne regije. Nakon toga izračunat je i omjer opsega struka i opsega bokova (engl. *Waist-to-hip ratio*, WHR).

Arterijski tlak mjereno je uz pomoću uređaja za mjerenje arterijskog tlaka OMRON M3 Comfort (Omron Healthcare Co., Ltd., Kyoto, Japan), u skladu s važećim smjernicama Europskog kardiološkog društva (engl. *The European Society of Cardiology*, ESC) (219).

Akumulacija AGEs u tkivu kože procijenjena je neinvazivnom metodom autofluorescencije, mjerenjem na desnoj podlaktici ispitanika, pomoću uređaja AGE Reader (DiagnOptics Technologies BV, Groningen, Nizozemska). Ova metoda pokazuje visoku korelaciju s koncentracijom AGEs u tkivu kože potvrđenom biopsijom kože (130). Obzirom na to da količina melanina u koži može utjecati na rezultate mjerenja, u istraživanje su uključeni isključivo sudionici s Fitzpatrick tipovima kože I do III. Za svakog su ispitanika provedena tri mjerenja, a u daljnjim analizama je korišten njihov prosjek. Na temelju dobivenih kvantitativnih vrijednosti, i nakon upisanog broja godina za pojedinog ispitanika, uređaj je pomoću vlastitog softvera klasificirao ispitanike u jednu od četiri kategorije kardiovaskularnog rizika, koje su za

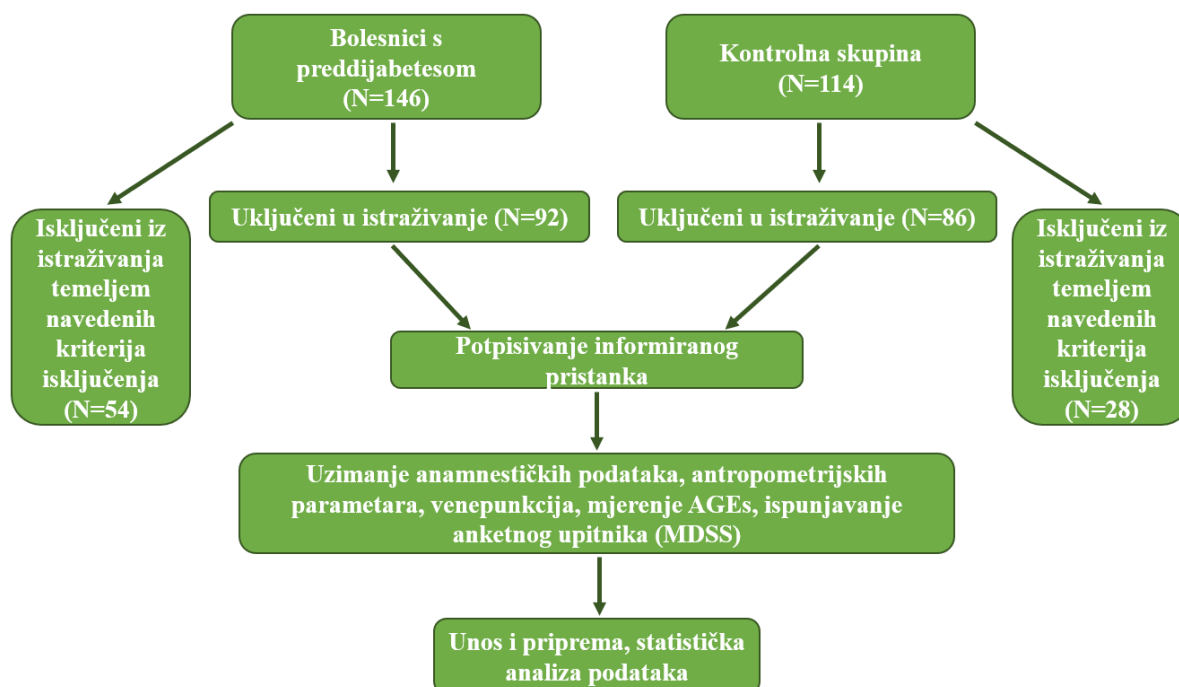
potrebe analize objedinjene u dvije skupine: „nizak/umjeren rizik“ i visok/vrlo visok rizik“. Intraindividualni koeficijent varijacije za ovu metodu iznosi manje od 5%.

Uzorci venske krvi prikupljeni su iz kubitalne vene svakog pojedinog ispitanika korištenjem sterilnih igala za jednokratnu upotrebu. Iz svakog uzorka analizirani su: kompletna krvna slika, lipidni profil, jetreni enzimi, glukoza natašte, HbA1c, urea, kreatinin i elektroliti. Dio uzorka bio je alikvotiran i pohranjen na -80°C radi naknadnog određivanja biomarkera. Plazmatske koncentracije AEA i 2-AG određene su kompetitivnom imunoenzimskom metodom (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA). Nakon odmrzavanja, uzorci su držani na ledu kako bi se smanjila enzimska razgradnja. Prije analize, plazma je bila prediluirana fosfatnim puferom (PBS, pH 7,2), u omjeru 1:4 za AEA i 1:5 za 2-AG, prema uputama proizvođača. Kvantifikacija je izvršena primjenom komercijalno dostupnih ELISA kompleta (Abbexa, Cambridge, UK), a apsorbancija je mjerena ELISA analizatorom Elisys Duo (Human Diagnostics Worldwide).

Koeficijenti varijacije unutar serije iznosili su manje od 10 % za AEA, a između serija manje od 12 % za 2-AG, što potvrđuje visoku preciznost i pouzdanost metode. Laboratorijski tehničari koji su provodili ELISA testove, kao i statističari zaduženi za naknadnu analizu podataka, bili su zaslijepljeni u pogledu grupne pripadnosti pojedinog sudionika.

Svaki sudionik ispunio je validirani upitnik o adherenciji mediteranskoj dijeti (engl. „*Mediterranean Diet Serving Score*“, MDSS) (220). MDSS se sastoji od 14 stavki i procjenjuje usklađenost s mediteranskim načinom prehrane prema najnovijim smjernicama mediteranske prehrane piramide. Sudionici su izvještavali o svojim uobičajenim prehranbenim navikama tijekom protekle godine, čime se procjenjivala dugoročna usklađenost s mediteranskom prehranom. Upitnik ocjenjuje učestalost konzumacije različitih namirnica i skupina hrane, pri čemu se 3 boda dodjeljuju za namirnice koje se jedu svaki obrok (kao što su voće, povrće, žitarice i maslinovo ulje), 2 boda za one koje se konzumiraju dnevno (mliječni proizvodi i orašasti plodovi), te 1 bod za tjedne namirnice (bijelo i crveno meso, riba, krumpir, mahunarke, jaja, slastice i vino). Ukupan zbroj od 14 ili više bodova ukazuje na dobru usklađenost sa smjernicama mediteranskog načina prehrane.

Hodogram istraživanja shematski je prikazan na **Slici 3**.



Slika 3. Hodogram istraživanja. Kratice: AGEs – krajnji produkti glikacije (engl. *Advanced glycation end products*); MDSS – upitnik o adherenciji mediteranskoj dijeti (engl. *Mediterranean Diet Serving Score*)

3.3. Statistička analiza podataka

Sve statističke analize provedene su korištenjem programa SPSS Statistics verzije 30.0 (IBM Corp., Armonk, NY, SAD) i GraphPad Prism verzije 10.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD). Za sve usporedbe P-vrijednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom. Normalnost distribucije podataka procijenjena je Shapiro-Wilkovim testom.

Kontinuirane varijable s normalnom distribucijom prikazane su kao aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija (SD), dok su varijable koje nisu slijedile normalnu distribuciju prikazane kao medijan s interkvartilnim rasponom (IQR). Kategorijske varijable prikazane su kao broj i postotak.

Za usporedbu dviju neovisnih skupina korišten je Studentov t-test za kontinuirane varijable s normalnom distribucijom, Mann-Whitneyjev U test za kontinuirane varijable koje nisu slijedile normalnu distribuciju te hi-kvadrat (χ^2) test za kategorijske varijable.

Za usporedbu više od dviju neovisnih skupina kontinuiranih varijabli koje nisu slijedile normalnu distribuciju korišten je Kruskal-Wallisov test. U podskupnim analizama ispitanici s predijabetesom razvrstani su prema tercilima vrijednosti sistoličkog arterijskog tlaka i tercilima

vrijednosti indeksa tjelesne mase, a razlike u plazmatskim koncentracijama AEA i 2-AG između navedenih tercila analizirane su Kruskal-Wallisovim testom. Budući da globalne usporedbe među tercilima nisu dosegnule statističku značajnost, dodatne *post-hoc* usporedbe nisu provedene.

Dodatno, u skupini ispitanika s predijabetesom provedena je podjela prema medijanu vrijednosti indeksa tjelesne mase, a razlike u plazmatskim koncentracijama AEA i 2-AG između skupina s nižim i višim indeksom tjelesne mase analizirane su Mann-Whitneyjevim U testom.

Spolne razlike u plazmatskim koncentracijama AEA i 2-AG analizirane su Mann-Whitneyjevim U testom u ukupnoj studijskoj populaciji te zasebno u podskupini ispitanika s predijabetesom.

Povezanost između plazmatskih koncentracija endokanabinoida i kontinuiranih kliničkih ili biokemijskih parametara procijenjena je Spearmanovom rang-korelacijskom analizom.

Kardiovaskularni rizik procijenjen AGE Reader algoritmom grupiran je u dvije kategorije. Skupina nižeg kardiovaskularnog rizika uključivala je ispitanike klasificirane kao „nema kardiovaskularnog rizika“ ili „ograničeni kardiovaskularni rizik“, dok je skupina višeg kardiovaskularnog rizika uključivala ispitanike klasificirane kao „povećani kardiovaskularni rizik“ ili „značajno povećani kardiovaskularni rizik“. Razlike u plazmatskim koncentracijama AEA i 2-AG između navedenih kategorija kardiovaskularnog rizika analizirane su Mann-Whitneyjevim U testom. Razlike u udjelu ispitanika s višim kardiovaskularnim rizikom između skupine s predijabetesom i kontrolne skupine analizirane su hi-kvadrat testom.

Adherencija mediteranskoj prehrani procijenjena je pomoću MDSS upitnika. Ukupan zbroj od 14 ili više bodova definiran je kao dobra adherencija mediteranskoj prehrani, dok je zbroj manji od 14 bodova definiran kao nedovoljna adherencija. Razlike u plazmatskim koncentracijama AEA i 2-AG između ispitanika s dobrom i nedovoljnom adherencijom mediteranskoj prehrani analizirane su Mann-Whitneyjevim U testom u ukupnoj studijskoj populaciji. Isti test korišten je i za usporedbu plazmatskih koncentracija AEA i 2-AG prema adherenciji pojedinim skupinama namirnica obuhvaćenima MDSS upitnikom. Povezanost ukupnog MDSS zbroja s plazmatskim koncentracijama AEA i 2-AG procijenjena je Spearmanovom rang-korelacijskom analizom.

Kako bi se u ukupnoj studijskoj populaciji ispitala neovisna povezanost predijabetesa i vrijednosti AGEs-a s plazmatskim koncentracijama AEA, provedena je višestruka linearna

regresijska analiza. U multivarijatni model uključeni su predijabetes, vrijednosti AGEs, dob, spol, indeks tjelesne mase i koncentracija glukoze natašte. Rezultati regresijske analize prikazani su kao regresijski koeficijent β s 95 % intervalom pouzdanosti, standardnom pogreškom i pripadajućom P-vrijednošću.

3.4. Izračun veličine uzorka

Veličina uzorka određena je korištenjem statističkog softvera MedCalc (verzija 20.113; MedCalc Software, Ostend, Belgija), temeljem preliminarnih podataka dobivenih iz pilot-istraživanja koje je uključivalo 10 bolesnika s predijabetesom i 10 zdravih ispitanika.

Procjena potrebne veličine uzorka temeljila se na glavnom ishodu – serumskoj koncentraciji endokanabinoida. Korištenjem Studentovog t-testa za usporedbu srednjih vrijednosti između dviju neovisnih skupina (pacijenata s predijabetesom i zdravih kontrola), uz pretpostavljenu alfa pogrešku od 5% i snagu istraživanja od 80 %, izračunato je da je za adekvatnu statističku moć potrebno uključiti najmanje 70 ispitanika u svakoj skupini kako bi se osigurala dovoljna statistička valjanost glavnog istraživanja.

4. REZULTATI

U istraživanje je uključeno ukupno 178 ispitanika, od toga 92 ispitanika s postavljenom dijagnozom predijabetesa i 86 ispitanika u kontrolnoj skupini, bez značajne razlike u dobi ispitanika između skupina. Analizom je utvrđeno da su ispitanici s predijabetesom imali statistički značajno više razine glikemije natašte ($P = 0,024$), HbA1c ($P = 0,031$), ITM ($P = 0,032$) te sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka ($P < 0,001$ za oba) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Razine ukupnog kolesterola ($P=0,038$) i triglicerida ($0,022$) bile su niže u ispitanika u kontrolnoj skupini. Nadalje, značajno veći udio ispitanika s predijabetesom klasificiran je u kategoriju povećanog ili značajno povećanog kardiovaskularnog rizika prema AGE Reader algoritmu u usporedbi s kontrolnom skupinom (44,6 % naspram 26,7 %, $P = 0,013$).

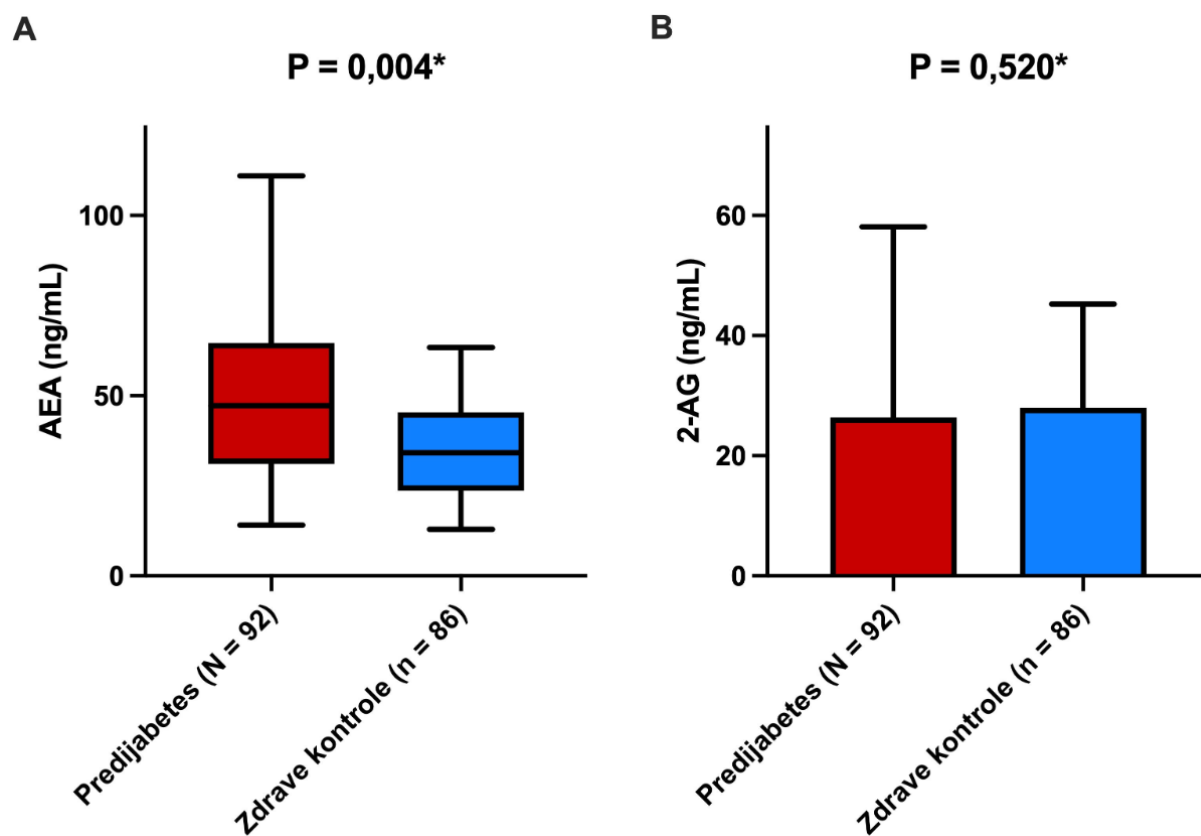
Preostale karakteristike ispitanika nisu se statistički značajno razlikovale između promatranih skupina. Osnovne karakteristike ispitanika prikazane su u **Tablici 2**.

Tablica 2 Osnovne karakteristike ispitanika koji su sudjelovali u istraživanju.

Parametar	Predijabetes (N=92)	Kontrole (N=86)	P*
Dob (<i>godine</i>)	54,2 ± 8,3	56,6 ± 9,1	0,067 *
Muški spol, <i>n</i> (%)	38 (41,3)	39 (45,3)	0,694 **
ITM (kg/m ²)	30,4 ± 3,8	26,4 ± 2,9	0,032 *
WHR	0,99 ± 0,31	0,96 ± 0,32	0,684 *
SBP (mmHg)	134,8 ± 11,9	123,2 ± 9,4	<0,001 *
DBP (mmHg)	84,9 ± 10,2	78,3 ± 7,6	<0,001 *
Glikemija natašte (mmol/L)	5,8 ± 0,6	5,1 ± 0,7	0,024 *
HbA1c (%)	5,9 ± 0,4	5,5 ± 0,3	0,031 *
Ukupni kolesterol (mmol/L)	5,7 ± 0,9	5,2 ± 1,1	0,038 *
LDL-C (mmol/L)	3,5 ± 0,7	3,3 ± 1,1	0,142 *
HDL-C (mmol/L)	1,6 ± 0,5	1,4 ± 0,4	0,234 *
Trigliceridi (mmol/L)	1,5 ± 0,9	1,2 ± 0,3	0,022 *
AST (U/L)	25,5 ± 7,8	24,1 ± 8,4	0,494 *
ALT (U/L)	26,2 ± 9,3	22,3 ± 9,1	0,382 *
Kreatinin (μmol/L)	78 ± 15	75 ± 15	0,765 *
AGEs	2,4 ± 0,5	2,2 ± 0,4	0,104 *

Podatci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ili cijeli broj (postotak). Kratice: ITM – indeks tjelesne mase; WHR – omjer opsega struka i bokova (engl. *waist to hip ratio*); SBP – sistolički arterijski tlak (engl. *systolic blood pressure*); DBP – dijastolički arterijski tlak (engl. *diastolic blood pressure*); HbA1c – glikirani hemoglobin A1c; LDL-C lipoprotein niske gustoće (engl. *low-density lipoprotein*); HDL – lipoprotein visoke gustoće (engl. *high-density lipoprotein*); AST – aspartat aminotransferaza; ALT – alanin aminotransferaza; AGEs – krajnji produkti glikacije (engl. *advanced glycation end products*). *t-test za nezavisne uzroke. **hi-kvadrat test.

U ispitanika s predijabetesom zabilježene su više razine AEA u plazmi u usporedbi s kontrolama podudarnima po dobi i spolu (47,2 (31,1 – 64,0) ng/mL u odnosu na 34,2 (23,6 – 44,8) ng/mL; $P = 0,004$; (**Slika 4A**). Nije utvrđena razlika između ispitanika s predijabetesom i kontrola u razinama 2-AG u plazmi ($25,5 \pm 9,2$ ng/mL u odnosu na $26,9 \pm 11,4$ ng/mL; $P = 0,520$; (**Slika 4B**).

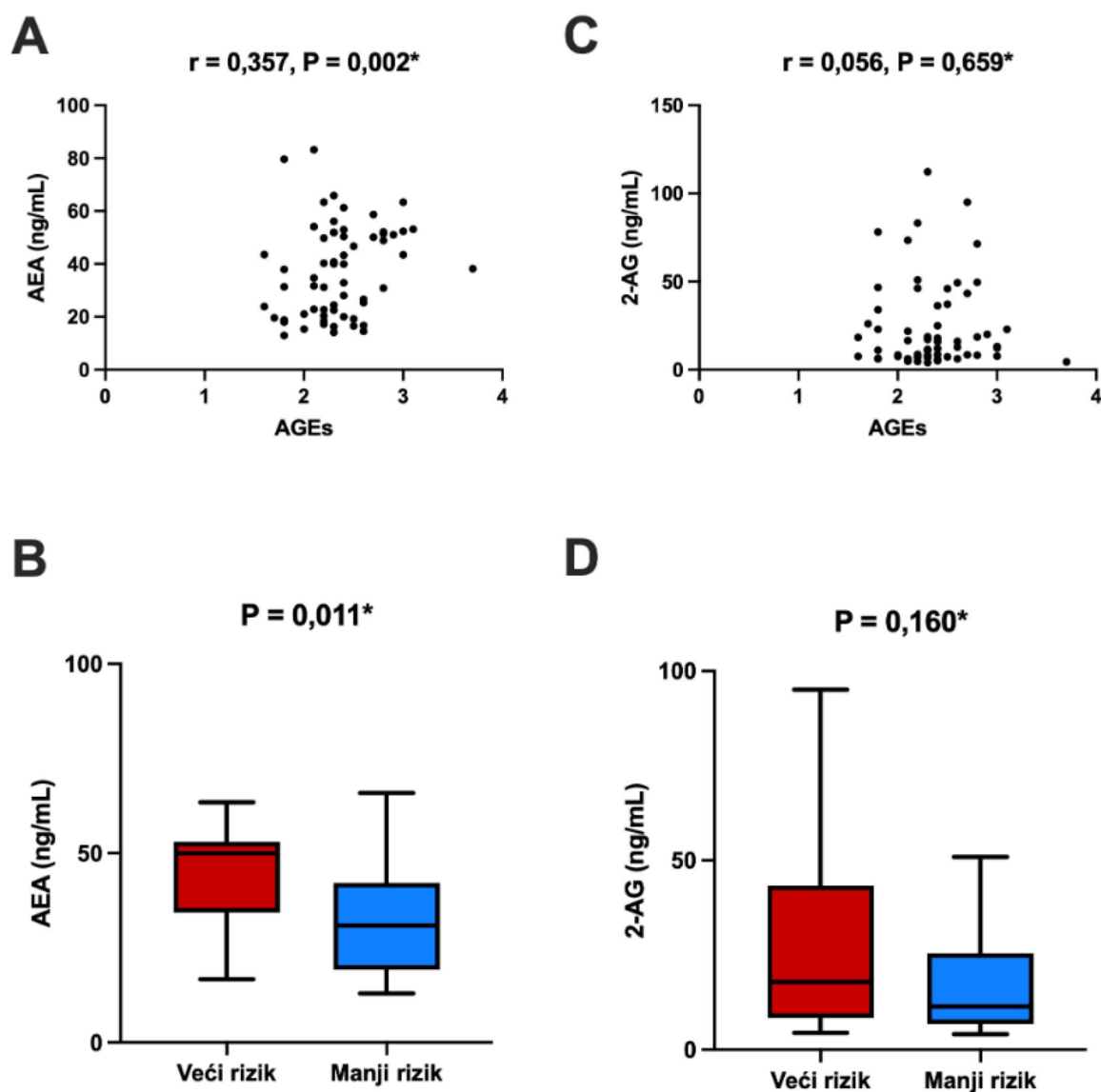


Slika 4. Usporedba razina endokanabinoida u plazmi između ispitanika s predijabetesom i zdravih kontrola (**A**) AEA; (**B**) 2-AG. Kratice: AEA: anandamid; 2-AG: 2-arahidonoilglicerol. *Ovisno o distribuciji korišten Mann–Whitney U test ili studentov t-test.

Univarijatna analiza pokazala je pozitivnu korelaciju između plazmatskih koncentracija AEA i vrijednosti AGEs-a u ispitanika s predijabetesom ($r = 0,357$; $P = 0,002$) (**Slika 5A**). Ovaj rezultat dodatno je potkrijepljen opažanjem da su ispitanici s predijabetesom u višoj kategoriji kardiovaskularnog rizika procijenjenoj AGE Reader algoritmom imali više plazmatske koncentracije AEA u odnosu na ispitanike niže kategorije rizika (50,0 (38,2–53,0) ng/mL naspram 30,9 (19,4–41,5) ng/mL; $P = 0,011$) (**Slika 5B**).

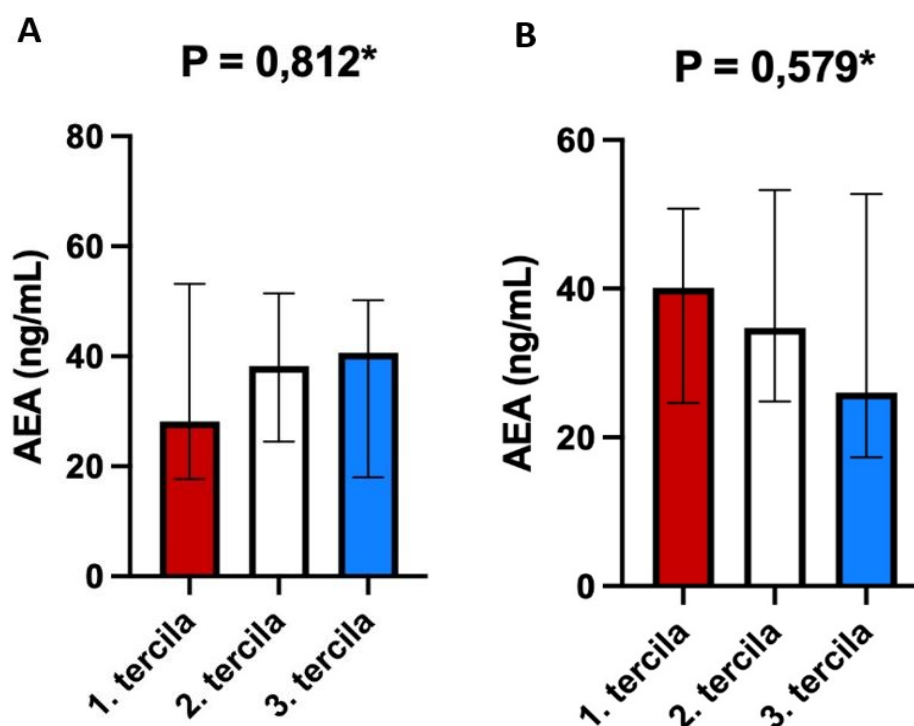
Nije utvrđena statistički značajna razlika u plazmatskim koncentracijama 2-AG između ispitanika s predijabetesom u višoj i nižoj kategoriji kardiovaskularnog rizika procijenjenoj AGE Reader algoritmom (11,4 (6,9–25,2) ng/mL naspram 17,9 (8,5–41,8) ng/mL; $P = 0,158$); (**Slika 5D**). Također, nije utvrđena korelacija između plazmatskih koncentracija 2-AG i vrijednosti AGEs-a u ispitanika s predijabetesom ($r = 0,056$; $P = 0,659$) (**Slika 5C**).

Skupina ispitanika s nižom kategorijom kardiovaskularnog rizika procijenjenom AGE Reader algoritmom uključivala je ispitanike klasificirane kao “nema kardiovaskularnog rizika” ili “ograničeni kardiovaskularni rizik”, dok je skupina s višom kategorijom rizika uključivala ispitanike klasificirane kao “povećani kardiovaskularni rizik” ili “značajno povećani kardiovaskularni rizik”, sukladno originalnoj stratifikaciji AGE Reader algoritma.

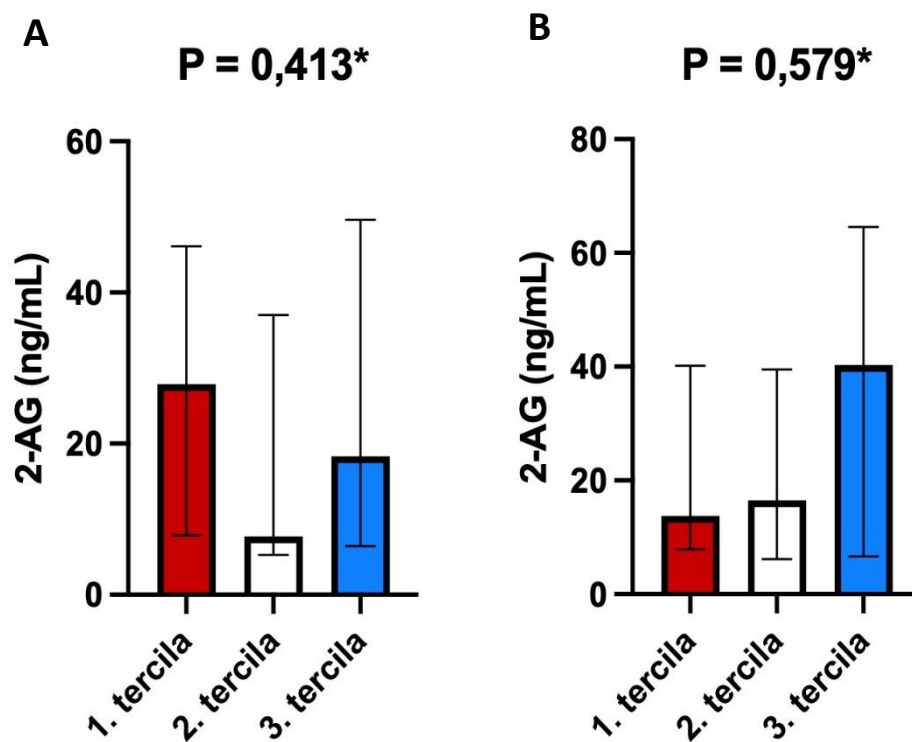


Slika 5. Povezanost plazmatskih koncentracija AEA i 2-AG s vrijednostima AGEs-a i kategorijom kardiovaskularnog rizika procijenjenom AGE Reader algoritmom: **(A)** korelacija između koncentracije AEA u plazmi i vrijednosti AGEs-a; **(B)** koncentracija AEA u plazmi stratificirana prema kategorijama kardiovaskularnog rizika procijenjenima AGE Reader algoritmom; **(C)** korelacija između koncentracije 2-AG u plazmi i vrijednosti AGEs-a; **(D)** usporedba koncentracije 2-AG u plazmi između skupina s višim i nižim kardiovaskularnim rizikom procijenjenim AGE Reader algoritmom. *Spearmanova rang-korelacijska analiza za panele A i C; Mann-Whitneyjev U test za panele B i D. Kratice: AEA – anandamid; 2-AG – 2-arahidonoilglicerol; AGEs – krajnji produkti glikacije engl. (*advanced glycation end products*).

Kako bi se istražila povezanost između koncentracije AEA i 2-AG s vrijednosti sistoličkog arterijskog tlaka odnosno ITM u ispitanika s predijabetesom, kreirali smo tri različite skupine prema tercilima vrijednosti sistoličkog tlaka odnosno ITM. Kruskal–Wallisovim testom ispitane su razlike u vrijednostima AEA i 2-AG između pojedinih podskupina te nije utvrđena statistički značajna razlika. Konkretno, za AEA (**Slika 6A i 6B**) nisu zabilježene razlike ovisno o tercilima sistoličkog tlaka ($P = 0,812$) niti ovisno o tercilima ITM ($P = 0,579$). Slično tome, vrijednosti 2-AG (**Slika 7A i 7B**) nisu se razlikovale između tercila sistoličkog tlaka ($P = 0,413$) niti između tercila ITM ($P = 0,579$).

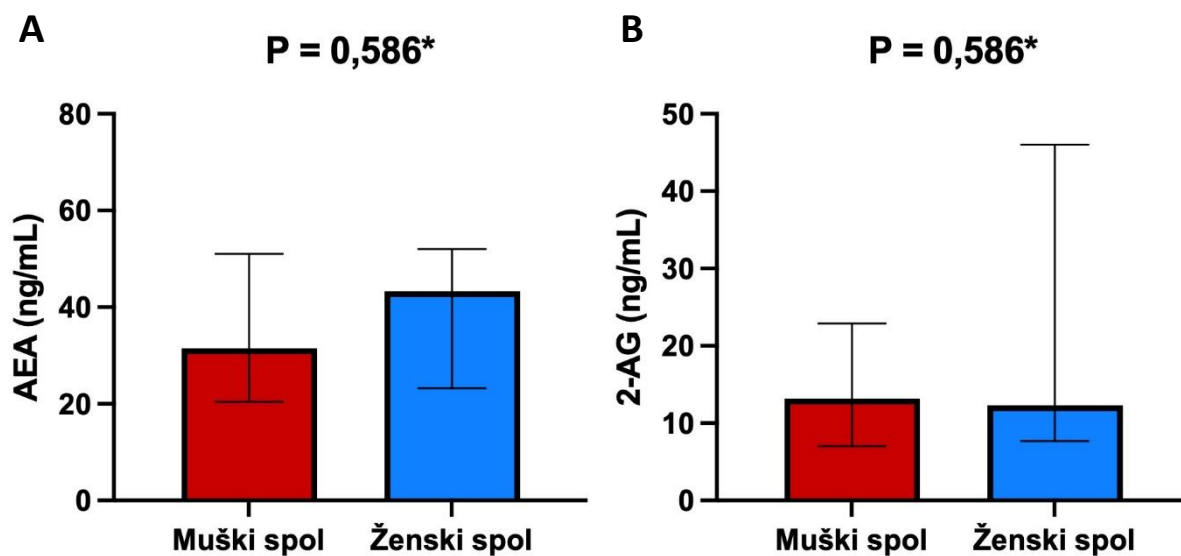


Slika 6. Povezanost između koncentracije AEA s tercilima vrijednosti sistoličkog tlaka (**6A**) odnosno ITM (**6B**) u ispitanika s predijabetesom. *Kruskal–Wallisov test. Kratice: AEA – anandamid.



Slika 7. Povezanost između koncentracije 2-AG s tercilama vrijednosti sistoličkog tlaka (**7A**) odnosno ITM (**7B**) u ispitanika s predijabetesom. *Kruskal–Wallisov test. Kratice: 2-AG – 2-arahidonoilglicerol.

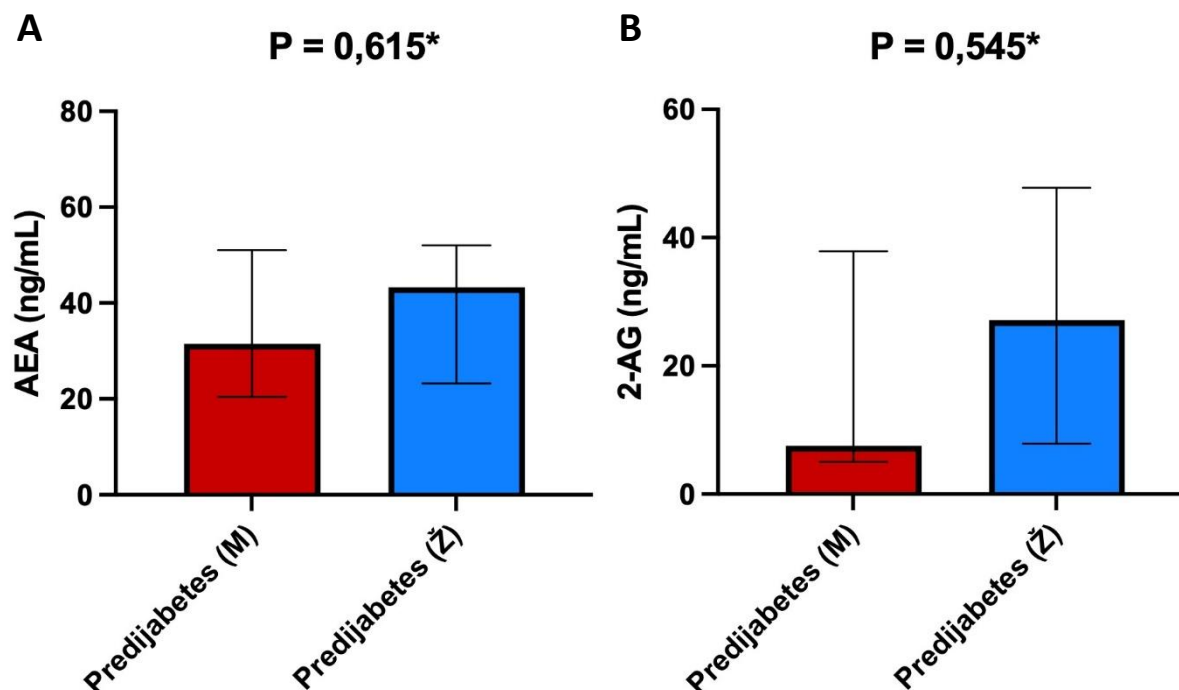
Nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentracijama AEA (34,54 [20,36-51,0] vs. 43,28 [23,16-51,98]; $P = 0,586$) (**Slika 8A**) i 2-AG (13,23 [7,04-22,9] vs. 12,3 [7,7-46,03]; $P = 0,586$) (**Slika 8B**) između muškaraca i žena u ukupnom uzorku ispitanika, uključujući ispitanike s predijabetesom i zdrave kontrole.



Slika 8. Razlike između koncentracije AEA (**8A**) i 2-AG (**8B**) po spolu u svih ispitanika.

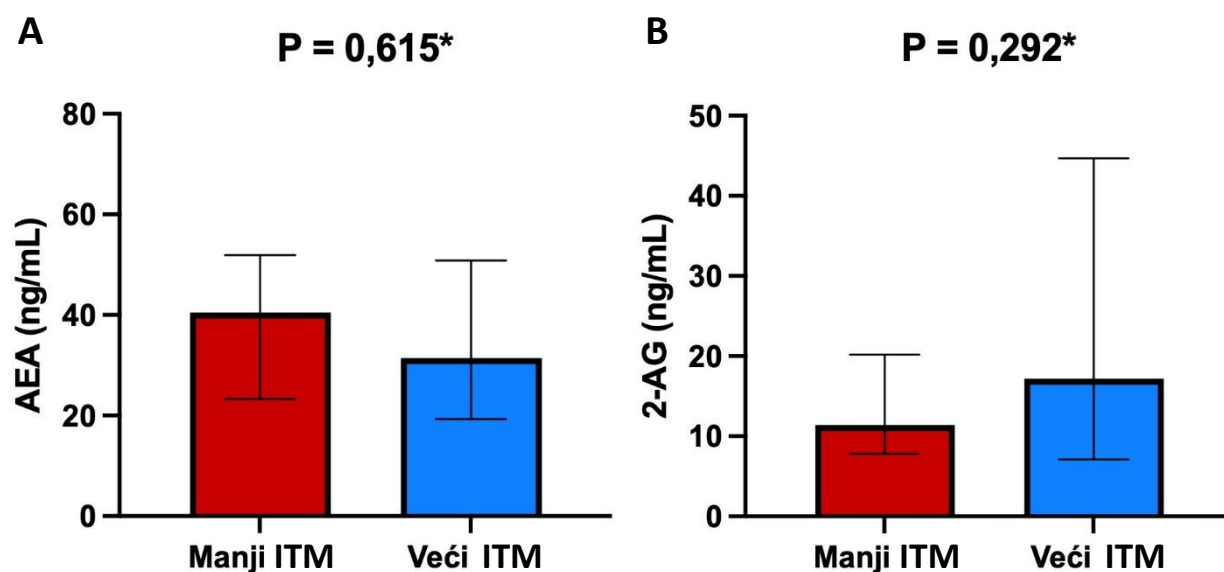
*Mann-Whitney test. Kratice: AEA – anandamid, 2-AG – 2-arahidonoilglicerol.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentracijama AEA (34,72 [22,22-55,95] vs. 38,96 [18,8-51,0]; $P = 0,615$) (**Slika 9A**) i 2-AG (7,5 [4,98-37,93] vs. 27,09 [7,93-47,75]; $P = 0,545$) (**Slika 9B**) između muškaraca i žena u skupini ispitanika s predijabetesom.



Slika 9. Razlike između koncentracije AEA (**9A**) i 2-AG (**9B**) po spolu u ispitanika s predijabetesom. *Mann-Whitney test. Kratice: AEA – anandamid, 2-AG – 2-arahidonoilglicerol.

Kako bi se istražila povezanost između koncentracije AEA i 2-AG s vrijednosti ITM-a u ispitanika s predijabetesom, kreirali smo dvije skupine prema medijanu vrijednosti ITM-a. Mann-Whitneyevim testom ispitane su razlike u vrijednostima AEA i 2-AG između pojedinih podskupina te nije utvrđena statistički značajna razlika. Konkretno, nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentracijama AEA (40,54 [23,34-51,88] vs. 31,36 [19,31-50,79]; $P = 0,615$) (Slika 10A) niti 2-AG (11,43 [7,84-20,25] vs. 17,21 [7,12-44,66]; $P = 0,292$) (Slika 10B) u skupini ispitanika s predijabetesom ovisno o ITM-u.



Slika 10. Razlike između koncentracije AEA (10A) i 2-AG (10B) prema skupinama ITM-a u ispitanika s predijabetesom. *Mann-Whitney test. Kratice: AEA – anandamid, 2-AG – 2-arahidonoilglicerol; ITM – indeks tjelesne mase

Analizom je utvrđeno da su ispitanici koji su se pridržavali mediteranske dijeta imali statistički značajno niže razine AEA u plazmi u usporedbi s onima koji se nisu pridržavali (38,0 (20,3-51,9 vs. 47,5 (27,7-51,8); $P = 0,038$), dok za 2-AG takva povezanost nije uočena. Nadalje, nije identificirana povezanost između pridržavanja pojedinim skupinama namirnica mediteranske dijeta i plazmatskih koncentracija niti AEA niti 2-AG. Usporedba plazmatskih koncentracija endokanabinoida u odnosu na pridržavanje pojedinačnim skupinama namirnica i mediteranskoj dijeti unutar svih ispitanika istraživanja prikazana je u **Tablici 3**.

Tablica 3 Usporedba plazmatskih koncentracija endokanabinoida u odnosu na pridržavanje pojedinačnim skupinama namirnica i mediteranskoj dijeti općenito u svih ispitanika (n = 178).

Parametar	AEA (ng/mL)			2-AG (ng/mL)		
	Adherentni	Neadherentni	P*	Adherentni	Neadherentni	P*
Žitarice	35,0 (18,3–61,1)	35,7 (21,1 – 55,1)	0,423	31,6 (23,0 – 41,1)	30,8 (24,1 – 39,9)	0,723
Krumpir	37,5 (19,0 – 65,1)	38,5 (22,0 – 61,1)	0,627	19,0 (13,7 – 29,7)	15,3 (12,5 – 23,0)	0,063
Maslinovo ulje	40,2 (20,2 – 68,2)	41,0 (23,2 – 62,3)	0,765	31,0 (22,0 – 40,6)	29,9 (23,5 – 39,0)	0,114
Orašasti plodovi	42,3 (22,3 – 70,3)	42,9 (25,3 – 65,0)	0,274	19,2 (10,0 – 29,0)	20,3 (12,5 – 28,4)	0,456
Voće	38,3 (20,3 – 63,0)	37,8 (24,3 – 60,1)	0,857	27,6 (18,1 – 36,6)	26,8 (19,7 – 36,0)	0,534
Povrće	41,1 (18,1 – 65,0)	41,4 (21,0 – 58,1)	0,539	32,5 (25,7 – 38,6)	31,9 (26,5 – 37,9)	0,798
Mliječni proizvodi	36,5 (15,1 – 58,2)	38,5 (19,0 – 54,2)	0,092	21,4 (12,0 – 30,9)	22,5 (13,1 – 31,5)	0,555
Mahunarke	39,2 (17,5 – 64,1)	38,4 (22,5 – 59,6)	0,102	27,4 (22,0 – 33,2)	26,2 (22,1 – 32,0)	0,364
Jaja	43,6 (23,0 – 72,6)	43,3 (26,6 – 66,5)	0,788	19,1 (11,2 – 29,0)	18,6 (11,9 – 27,8)	0,277
Riba	37,5 (16,0 – 61,5)	36,8 (21,7 – 57,7)	0,234	21,9 (13,6 – 30,5)	22,4 (15,1 – 29,9)	0,355
Bijelo meso	44,2 (24,2 – 64,2)	44,0 (25,3 – 62,3)	0,698	44,4 (37,0 – 51,3)	43,5 (37,5 – 50,4)	0,243
Crveno meso	42,7 (24,3 – 73,3)	44,9 (27,3 – 67,0)	0,082	28,7 (22,5 – 35,8)	29,2 (24,1 – 36,0)	0,756
Slatkiši	39,3 (21,3 – 62,4)	39,8 (24,6 – 62,1)	0,586	25,7 (12,5 – 34,0)	26,0 (21,9 – 34,5)	0,819
Vino	41,5 (18,6 – 64,0)	43,4 (26,0 – 57,1)	0,094	32,1 (26,8 – 40,8)	31,5 (27,4 – 39,9)	0,745
Adherencija	38,0	47,5	0,038	18,2	21,5	0,653
MD †	(20,3 – 51,9)	(27,7 – 51,8)		(12,8 – 30,8)	(16,2 – 27,9)	

Podatci su prikazani kao medijan (IQR). *Mann–Whitney U test; †prema rezultatu MDSS (engl. *The Mediterranean Diet Serving Score*) upitnika. Kratice: AEA – anandamid, 2-AG – 2-arahidonoilglicerol; MD – Mediteranska prehrana (engl. *Mediterranean diet*).

Analiza korelacije plazmatskih koncentracija AEA i 2-AG s relevantnim kliničkim i biokemijskim parametrima detaljno je prikazana u **Tablici 4**. Univarijatna analiza pokazala je pozitivnu korelaciju dobi s koncentracijom AEA u plazmi ($P < 0,001$), dok slična povezanost s razinama 2-AG nije uočena ($P = 0,180$). Postojala je pozitivna korelacija ITM ($P = 0,002$), a negativna korelacija dijastoličkog tlaka ($P = 0,009$) i HDL-C ($P < 0,001$), s razinom 2-AG u plazmi. Nadalje, postojala je pozitivna korelacija HDL-C ($P = 0,005$), te negativna korelacija dijastoličkog tlaka ($P = 0,013$) i glikemije natašte ($P < 0,001$), s koncentracijom AEA u plazmi.

Tablica 4 Analiza korelacije plazmatskih razina endokanabinoida s odabranim kliničkim i laboratorijskim karakteristikama u ukupnoj studijskoj populaciji (n = 178).

Parametar	AEA (ng/mL)	P	2-AG (ng/mL)	P
	Korelacijski koeficijent r *		Korelacijski koeficijent r *	
Dob (<i>godine</i>)	0,304	<0,001	−0,101	0,180
ITM (kg/m ²)	0,147	0,050	0,231	0,002
WHR	0,065	0,389	0,124	0,099
SBP (mmHg)	0,065	0,389	0,064	0,396
DBP (mmHg)	−0,185	0,013	−0,195	0,009
Glikemija natašte (mmol/L)	−0,323	<0,001	−0,085	0,259
Ukupni kolesterol (mmol/L)	0,034	0,652	−0,094	0,212
LDL-C (mmol/L)	−0,095	0,207	0,016	0,832
HDL-C (mmol/L)	0,211	0,005	−0,341	<0,001
Trigliceridi (mmol/L)	0,114	0,130	0,056	0,458
Kreatinin (μmol/L)	0,214	0,004	−0,105	0,163
MDSS (<i>bodovi</i>)	−0,203	0,007	0,062	0,437

*Spearmanova korelacijska analiza. Kratice: AEA – anandamid; 2-AG – 2-arahidonoilglicerol; ITM – indeks tjelesne mase; WHR – omjer opsega struka i bokova (engl. *waist to hip ratio*); SBP – sistolički arterijski tlak (engl. *systolic blood pressure*); DBP – dijastolički arterijski tlak (engl. *diastolic blood pressure*); LDL-C lipoprotein niske gustoće (engl. *low-density lipoprotein*); HDL – lipoprotein visoke gustoće (engl. *high-density lipoprotein*); MDSS – upitnik o adherenciji MD (engl. *The Mediterranean Diet Serving Score*).

Kako bi se utvrdila neovisna povezanost predijabetesa i razina AGEs s plazmatskim koncentracijama AEA, primijenjena je višestruka linearna regresijska analiza. Multivarijatna analiza potvrdila je da su i predijabetes i vrijednosti AGEs pozitivno povezani s koncentracijom AEA u plazmi, neovisno o dobi, spolu, ITM i razinama glikemije natašte. Multivarijatna analiza izabranih parametara povezanih s razinama AEA u plazmi prikazana je u **Tablici 5**.

Tablica 5 Multivarijatna analiza izabranih parametara povezanih s razinama AEA u plazmi.

Parametar	β (95% CI) †	SE	P
Predijabetes (vs. kontrole)	11,9 (3,7 – 20,1)	4,1	0,005
AGEs	0,25 (0,09 – 0,41)	0,08	0,003
Dob (<i>godine</i>)	0,31 (0,09 – 0,53)	0,11	0,007
Spol (muški vs. ženski)	–1,4 (–8,8 – 6,0)	3,7	0,712
ITM (kg/m ²)	0,06 (–0,26 – 0,38)	0,16	0,702
Glikemija natašte (mmol/L)	–0,88 (–3,9 – 2,1)	1,5	0,561

†multipla linearna regresijska analiza; SE – standardna pogreška. Kratice: AEA – anandamid; AGE – krajnji produkti glikacije (engl. *advanced glycation end products*); ITM – indeks tjelesne mase.

5. RASPRAVA

Rezultati provedenog istraživanja ukazuju na to da ispitanici s predijabetesom imaju više razine AEA u plazmi u usporedbi s ispitanicima u kontrolnoj skupini usklađenima prema dobi i spolu. Ovakvi rezultati u skladu su s ranijim istraživanjima koja upućuju na to da ECS može biti disreguliran u različitim metaboličkim bolestima.

Pregledni rad *Nogueirasa i sur.* ističe ulogu ECS-a u regulaciji metabolizma glukoze i energije, pri čemu se posebno ističe činjenica kako AEA može modulirati lučenje inzulina te osjetljivost tkiva na inzulin. Nadalje, klinički i eksperimentalni podaci dobiveni na životinjskim modelima snažno upućuju na to da blokada CB₁R ima povoljne učinke na metabolizam glukoze i poboljšanje inzulinske osjetljivosti (221). ECS ima ulogu u modulaciji komunikacije između središnjeg živčanog sustava i perifernih organa te usklađuje funkcionalnu aktivnost tkiva uključenih u regulaciju metabolizma lipida i glukoze (222). Aktivacija kanabinoidnih CB₁R u perifernim tkivima, osobito u jetri, masnom tkivu i skeletnim mišićima, povezuje se s poremećajem metaboličke homeostaze, koji se očituje smanjenom osjetljivošću na inzulin, pojačanom jetrenom glukoneogenezom i lipogenezom. Posebno je aktivacija jetrenih CB₁R povezana s razvojem pretilosti i inzulinske rezistencije, pri čemu doprinosi narušenoj regulaciji metabolizma glukoze i lipida, povećanom unosu i pohrani energije te pojačanom razinom oksidativnog stresa i proinflamatornim učinkom (223). Povišene razine AEA u stanju predijabetesa mogu predstavljati odraz kompenzacijskih mehanizama organizma koji se aktiviraju kao odgovor na razvoj inzulinske rezistencije, s ciljem privremenog očuvanja metaboličke ravnoteže i homeostaze glukoze (221). Nadalje, navedeni rezultat u skladu je s prethodnim istraživanjima koja ukazuju na povezanost povišenih koncentracija AEA s disfunkcijom koronarne cirkulacije u osoba s pretilošću (224), stanjem usko povezanim s predijabetesom putem niza međusobno isprepletenih mehanizama, uključujući povećano nakupljanje visceralnog masnog tkiva, razvoj inzulinske rezistencije, poremećaje u metabolizmu glukoze te druge povezane metaboličke i vaskularne promjene (225). Slično tome, povišene razine AEA uočene su i u tkivu mrežnice u pacijenata s razvijenom dijabetičkom retinopatijom, što upućuje na mogućnost da AEA predstavlja potencijalni biomarker koji povezuje metaboličke poremećaje s vaskularnim komplikacijama dijabetesa (226).

Rezultati četiriju multicentričnih i multinacionalnih „RIO“ (engl. *Rimonabant in Obesity*) studija konzistentno potvrđuju da farmakološka blokada CB₁R rimonabantom dovodi ne samo do klinički značajnog smanjenja tjelesne mase i opsega struka, nego i do istodobnog poboljšanja niza kardiometaboličkih rizičnih čimbenika. U studiji „RIO-Lipids“, u populaciji prekomjerno uhranjenih i pretilih bolesnika s dislipidemijom, primjena rimonabanta rezultirala

je dodatnim prosječnim gubitkom tjelesne mase i smanjenjem opsega struka u odnosu na placebo, uz istodobno značajno sniženje triglicerida, porast HDL kolesterola, kao i pretvorba LDL čestica u manje aterogene subfrakcije lipoproteina. Istovremeno je zabilježen porast koncentracije adiponektina, koji je samo djelomično objašnjen gubitkom tjelesne mase, što upućuje na izravne metaboličke učinke CB₁R blokade u masnom tkivu (227). Sličan obrazac zapažen je i u ostalim „RIO“ studijama, u kojima je rimonabant, u usporedbi s placebom, doveo do poboljšanja inzulinske osjetljivosti, sniženja koncentracija inzulina i glukoze natašte te smanjenja HbA_{1c} u pretilih bolesnika s visokim metaboličkim rizikom, osobito u skupini s T2DM-om. Uz to su zabilježena umjerena sniženja arterijskog tlaka i smanjenje prevalencije metaboličkog sindroma, što dodatno podupire koncept visceralne pretilosti kao centralnog terapijskog cilja (228-230). Ukupno gledano, skupina RIO studija pruža snažan dokaz da farmakološka inhibicija ECS-a može istodobno djelovati na tjelesnu masu, visceralnu mast i ključne kardiometaboličke parametre. Međutim, kliničku primjenjivost ovakvog pristupa ograničila je pojava psihijatrijskih nuspojava (depresija, anksioznost), koje su u „RIO-Lipids“ studiji bile najčešći razlog prekida terapije (227), što je bio i glavni razlog za povlačenje lijeka s tržišta od strane najvećih svjetskih regulatornih agencija (FDA, EMA). Navedeno naglašava potrebu za razvojem sigurnijih, selektivnijih modulatora ECS-a.

S druge strane, u provedenom istraživanju, razine 2-AG nisu se razlikovale između ispitanika s predijabetesom i kontrolne skupine. To je u skladu s nalazima drugih istraživanja koja upućuju na različitu fiziološku regulaciju AEA-a i 2-AG-a te njihove različite uloge u kardiometaboličkim bolestima (231, 232). Ova divergentna opažanja vjerojatno proizlaze iz temeljnih razlika u putevima biosinteze i razgradnje endokanabinoida - AEA se pretežito hidrolizira putem enzima FAAH-e, dok se 2-AG uglavnom metabolizira uz pomoć MAGL-a (166, 170). Varijacije u tkivno specifičnoj ekspresiji enzima, dostupnosti supstrata i lokalnim metaboličkim zahtjevima mogu rezultirati različitim cirkulirajućim razinama. Nadalje, AEA i 2-AG razlikuju se prema svojim afinitetima i učinkovitosti na CB₁R i CB₂R (170), što se može odraziti u njihovim različitim fiziološkim i patofiziološkim ulogama. To naglašava potrebu da se svaki endokanabinoidni ligand razmatra zasebno pri tumačenju njegova doprinosa ukupnoj metaboličkoj regulaciji u organizmu.

U ovom istraživanju nisu utvrđene statistički značajne razlike u koncentracijama AEA-a i 2-AG-a između muškaraca i žena, iako je zabilježen trend viših vrijednosti oba eCB u žena. Ovi se nalazi mogu djelomično usporediti s rezultatima *Matte i sur.*, koji su u populaciji ispitanika s metaboličkim sindromom pokazali izostanak spolnih razlika u koncentracijama 2-

AG-a. Navedeni autori pritom ističu da menopauza predstavlja jedan od čimbenika koji može modulirati cirkulirajuće koncentracije 2-AG-a. Nasuprot tomu, koncentracije AEA-a u istoj su studiji bile više u žena nego u muškaraca, a spolne razlike u koncentraciji AEA-a opisane su i u ranijim istraživanjima (233). Stoga naši rezultati sugeriraju da su spolne razlike u cirkulirajućim eCB-ima u metabolički rizičnim populacijama vjerojatno suptilne i pod utjecajem više bioloških i metaboličkih čimbenika, zbog čega ne moraju biti dosljedno potvrđene u svim ispitivanim uzorcima.

Kumulativni podaci iz literature upućuju na to da povišene koncentracije AEA i pojačana aktivnost ECS-a pridonose razvoju i progresiji inzulinske rezistencije. *Annuzzi i sur.* izvijestili su o povišenim razinama AEA u potkožnom masnom tkivu pretilih bolesnika s T2DM-om, uz istodobno povećanje ekspresije leptinskog mRNA i koncentracija slobodnih masnih kiselina, što upućuje na potencijalnu interakciju lipotoksičnih i endokanabinoidnih signala u adipocitima (234). U skladu s time, u mišjem modelu *Liu i sur.* pokazali su da AEA-posredovana aktivacija hepatičnog CB₁R dovodi do intolerancije glukoze; učinak koji izostaje u CB₁-knockout životinja; čime se dodatno podupire uloga CB₁R signalizacije u razvoju metaboličke disfunkcije (235). Na kliničkoj razini, osmotjedno randomizirano kontrolirano ispitivanje pokazalo je da prelazak sa zapadnjačkog na izokalorični mediteranski obrazac prehrane snižava jutarnje koncentracije AEA i poboljšava HOMA-IR, implicirajući protektivnu ulogu mononezasićenih masnih kiselina i polifenola u modulaciji hiperaktivnosti ECS-a (236). Komplementarno, recentni mehanicistički podatci pokazuju da 2-AG-inducirano CB₁R signaliziranje u monocitima potiče ekspresiju rezistina, inicirajući upalni odgovor u masnom tkivu i posljedičnu progresiju inzulinske rezistencije. Farmakološka blokada CB₁R reverzibilno poništava taj učinak, čime se funkcionalna os 2-AG/CB₁–rezistin potvrđuje kao relevantna meta za eventualne buduće intervencije (237).

Zajednički, ovi rezultati sugeriraju da modulacija ECS-a promjenom prehranbenih navika može prigušiti nizvodne proinflamatorne medijatore poput rezistina. Ipak, potrebno je dodatno razjasniti u kojoj je mjeri taj mehanizam zastupljen u osoba s predijabetesom te može li visoka adherencija mediteranskoj prehrani istodobno sniziti razine endokanabinoidnih liganada, rezistina i ukupnog opterećenja AGEs spojevima.

U ispitanika s predijabetesom plazmatske koncentracije AEA pozitivno su korelirale s vrijednostima AGEs-a, koji predstavljaju pokazatelj kumulativnog metaboličkog stresa i dugotrajnije izloženosti glikacijskim i oksidativnim procesima (238). Sukladno tome,

multivarijatna analiza potvrdila je da su predijabetes i vrijednosti AGEs neovisno povezani s razinama AEA u plazmi, i nakon prilagodbe za potencijalne čimbenike zamjene, uključujući dob, spol, ITM i koncentraciju glukoze u plazmi natašte. Nadalje, u bolesnika s većim kardiovaskularnim rizikom procijenjenim AGE Reader algoritmom utvrđene su povišene razine AEA u plazmi u usporedbi s ispitanicima nižeg rizika. *Rajesh i sur.* sugeriraju da pretjerana aktivacija ECS-a i CB₁R može imati ključnu ulogu u patogenezi dijabetičke kardiomiopatije, među ostalim tako što potiče ekspresiju, nakupljanje i/ili signalizaciju RAGEs-a i samih AGEs-a, čime se dodatno pojačavaju upalni i fibrogeni procesi u tkivu miokarda (239).

Povišene razine različitih AGEs-a utvrđene su u serumu i tkivima bolesnika s dijabetesom. Brojna su istraživanja prethodno pokazala povezanost između pojačane produkcije AGEs-a i razvoja kroničnih komplikacija dijabetesa, što upućuje na njihovu ulogu ne samo kao potencijalnih bioloških markera, već i kao prediktora nepovoljnih kliničkih ishoda (240,241). Iako je prognostička vrijednost razine AGEs-a za procjenu kardiovaskularnog rizika i s dijabetesom povezanih komplikacija dobro dokumentirana u osoba s već dijagnosticiranim T2DM-om, i dalje nedostaje čvrstih dokaza koji bi potvrdili njihovu prognostičku vrijednost u kontekstu predijabetesa. Sustavni pregled i metaanaliza koju su proveli *Lu i sur.* pokazali su da je visok unos egzogenih AGEs-ova (pretežito putem prehrane bogate AGEs-ovima nastalim tijekom termičke obrade hrane na visokim temperaturama i pri niskoj vlažnosti, kao što su pečenje na žaru, prženje i pečenje u pećnici) povezan s povišenim koncentracijama glukoze u plazmi natašte, povećanim razinama inzulina te izraženijom inzulinskom rezistencijom. Navedeni parametri predstavljaju ključne pokazatelje predijabetesa i povećanog rizika za razvoj T2DM-a (242). Nadalje, *Birukov i sur.* proveli su istraživanje koje upućuje na to da povišene razine AGEs-a, izmjerene metodom kožne autofluorescence mogu doprinositi povećanju vaskularne krutosti neovisno o dobi i drugim kardiometaboličkim čimbenicima rizika. Ovaj učinak nije ograničen samo na bolesnike s dijabetesom, već je zabilježen i u uvjetima normoglikemije i predijabetesa, što sugerira da nakupljanje AGEs-a može imati važnu ulogu u ranoj fazi kardiovaskularnih poremećaja, prije kliničke manifestacije T2DM-a (243). S druge strane, u sklopu „SALIA“ studije istraživao je odnos između koncentracija AGEs-a u plazmi i poremećaja glikemije natašte. Rezultati nisu pokazali značajne razlike u razinama AGEs-a između ispitanika s normalnom glukozom natašte i onih s oštećenom glikemijom natašte, što sugerira da cirkulirajući AGEs-i možda nemaju snažnu povezanost s ranijim stadijima poremećaja metabolizma glukoze. Ovi nalazi upućuju na mogućnost da se klinički relevantna akumulacija AGEs-a javlja u kasnijim fazama disglikemije ili da su za ranu detekciju

metaboličkih promjena informativniji drugi biomarkeri (244). Zajednički promatrani, ovi nalazi podupiru sve veći broj dokaza koji sugeriraju da disregulacija ECS-a, osobito AEA-signalizacije, može imati važnu ulogu u ranoj metaboličkoj disfunkciji. Prethodna su istraživanja pokazala da AEA može modulirati inzulinsku osjetljivost, upalne procese i endotelnu funkciju, što su ključne komponente patofiziologije predijabetesa, pretilosti i ateroskleroze (245, 246).

Izostanak povezanosti između 2-AG-a i predijabetesa, kao i između 2-AG-a i razina AGEs-a, može odražavati različite metaboličke putove i afinitet za endokanabinoidne receptore između AEA-a i 2-AG-a, kao i razlike u njihovoj tkivno specifičnoj sintezi i razgradnji (187, 247).

Bolja adherencija MD-i bila je povezana s nižim razinama AEA-a u plazmi, dok takva povezanost nije utvrđena ni za koncentracije 2-AG ni za stupanj pridržavanja preporučenog unosa pojedinačnih skupina namirnica. Ovakvi rezultati sugeriraju da ukupni prehrambeni obrazac, a ne izolirana konzumacija pojedinih namirnica, može imati specifičan modulirajući učinak na AEA-signalizaciju unutar ECS-a. Vjerojatno je da upravo sinergijsko djelovanje polifenola, jednostruko nezasićenih masnih kiselina, prehrambenih vlakana i omega-3 masnih kiselina predstavlja temelj ovakve modulacije. Stoga se čini da cjelokupni prehrambeni obrasci imaju snažnije biološke učinke na regulaciju ECS-a i opterećenje AGEs-a od pojedinačnih prehrambenih komponenti, što naglašava translacijsku važnost holističkih prehrambenih intervencija. Takav pristup, usmjeren na integrirani utjecaj različitih nutrijenata i njihovih međusobnih interakcija, potencijalno je učinkovitiji u modulaciji rizičnih metaboličkih putova i prevenciji kardiometaboličkih komplikacija. Ovakvi rezultati sukladni su nalazima randomiziranog kontroliranog ispitivanja koje su proveli *Rossi i sur.*, a koje je pokazalo da osmotjedna intervencija pojačanim pridržavanjem mediteranskog načina prehrane dovodi do značajnog smanjenja cirkulirajućih koncentracija AEA-a, neovisno o promjenama tjelesne mase (248). MD, obilježena visokim unosom jednostruko nezasićenih masnih kiselina, prehrambenih vlakana i polifenola, povezuje se sa sniženjem endokanabinoidnog tonusa te s posljedično protektivnim kardiovaskularnim djelovanjem (215, 249). Navedeni nutrijenti mogu djelovati putem promjene profila masnih kiselina u plazmi i tkivima, smanjenja oksidativnog stresa te modulacije sastava i funkcionalne aktivnosti crijevne mikrobiote (236, 250). Povezanost mediteranskog prehrambenog obrasca s razinama AEA-a, ali ne i s razinama 2-AG-a, u skladu je s nalazima pokusnih istraživanja na životinjama koja ukazuju na diferencijalnu regulaciju ovih endokanabinoida sastavom masnih kiselina u prehrani. Eksperimentalni podaci

sugeriraju da različiti profili unosa masnih kiselina selektivno utječu na sintezu i razgradnju AEA-a i 2-AG-a, što može objasniti specifičnu osjetljivost AEA-a na promjene prehranbenog obrasca, dok 2-AG ostaje relativno manje podložan takvim nutritivnim modulacijama (251). Nadalje, omega-3 višestruko nezasićene masne kiseline, koje su u mediteranskoj prehrani zastupljene u relativno visokim količinama, dodatno reduciraju aktivnost ECS-a i intenzitet upalnih procesa, čime dodatno pojačavaju njezine povoljne učinke na vaskularnu funkciju (252).

Zajednički promatrani, rezultati provedenog istraživanja ističu potencijal AEA-a kao biomarkera koji povezuje metaboličku disfunkciju s vaskularnim rizikom u populaciji s predijabetesom. Uočena povezanost između AEA-a i AGEs-ova upućuje na važnu ulogu endokanabinoidne signalizacije u ranim fazama kardiometaboličke bolesti, otvarajući mogućnost za nove pristupe u stratifikaciji rizika i ciljanom terapijskom djelovanju. Posebno je značajno što ovi nalazi pozicioniraju AEA kao potencijalni rani marker metaboličkog stresa i povišenog vaskularnog rizika u predijabetesu. Osjetljivost razine AEA-a na patofiziološke promjene koje vjerojatno prethode manifestnom T2DM-u sugerira da bi praćenje koncentracija AEA-a u plazmi moglo unaprijediti ranu detekciju i procjenu rizika, te omogućiti individualizirane preventivne intervencije. Ipak, nužna su dodatna longitudinalna ispitivanja na većim populacijama kako bi se potvrdila stvarno prognostička vrijednost AEA-a kao biomarkera i primjenjivost u rutinskoj kliničkoj praksi.

Provedeno istraživanje među prvima je koje ispituje povezanost cirkulirajućih endokanabinoida i AGEs-a u populaciji s predijabetesom. Unutarnju valjanost nalaza povećavaju jasno definirana, po dobi i spolu uparena kontrolna skupina, strogi kriteriji isključenja te uporaba validiranog upitnika u procjeni adherencije ispitanika mediteranskom tipu prehrane (*Mediterranean Diet Serving Score*, MDSS). Nadalje, zasljepljivanje laboratorijskog osoblja i analitičara podataka u pogledu skupinske pripadnosti sudionika minimiziralo je rizik pristranosti mjerenja te osiguralo objektivnu interpretaciju laboratorijskih nalaza.

Istodobno, potrebno je istaknuti ograničenja provedenog istraživanja. Iako je veličina uzorka osigurala dovoljnu snagu za primarne analize, ona može ograničiti mogućnost poopćavanja zaključaka na širu populaciju. Uključivanje isključivo ispitanika bijele rase sužava primjenjivost nalaza na druge etničke/rasne skupine s potencijalno različitim endokanabinoidnim profilima i metaboličkim obilježjima.

Ograničenje ovog istraživanja jest i izostanak detaljnih mjera tjelesnog sastava, poput bioimpedancijski procijenjene mase i postotka masnog tkiva. Iako su ITM i WHR široko korišteni i informativni pokazatelji adipoziteta, sve više dokaza ukazuje na dodatnu vrijednost precizne procjene tjelesnog sastava u stratifikaciji metaboličkog rizika. Buduća istraživanja koja će uključiti izravnu evaluaciju količine i distribucije masnog tkiva mogla bi produbiti uvid u odnose između adipoziteta, aktivnosti ECS-a i akumulacije AGEs-a u predijabetesu. Nadalje, procjena kardiovaskularnog rizika u ovom istraživanju temeljila se isključivo na AGE Reader algoritmu, a ne na klasičnim kliničkim modelima procjene kardiovaskularnog rizika ili praćenju kardiovaskularnih događaja. Dodatno, nisu prikupljeni detaljni podaci o pojedinim životnim navikama (npr. pušenje, konzumacija alkohola (osim vina), kvaliteta sna,...) ni o popratnoj farmakoterapiji, što je moglo utjecati na ishode.

Zaključno, monocentrični dizajn istraživanja može biti uzrok pristranosti povezane s institucionalnim praksama te regionalnim životnim i prehrambenim navikama. Također, presječni dizajn istraživanja onemogućuje uspostavu kauzalnih odnosa između plazmatskih razina AEA-a, predijabetesa i opterećenja AGEs-a. Stoga su potrebna longitudinalna istraživanja, s uključivanjem objektivnih mjera tjelesnog sastava i detaljnih podataka o ponašajnim čimbenicima, kako bi se razjasnile vremenske dinamike i kauzalni putovi koji povezuju adipozitet, aktivnost ECS-a i akumulaciju AGEs-a u predijabetesu.

6. ZAKLJUČCI

1. U ispitanika s predijabetesom zabilježene su više razine AEA u plazmi u usporedbi s kontrolama podudarnima po dobi i spolu.
2. Nije utvrđena statistički značajna razlika razine 2-AG u plazmi između ispitanika s predijabetesom i kontrola.
3. Značajno veći udio ispitanika s predijabetesom klasificiran je u kategoriju povećanog kardiovaskularnog rizika temeljenog na mjerenju AGEs u usporedbi s kontrolnom skupinom.
4. U ispitanika s predijabetesom u kojih postoji veći kardiovaskularni rizik procijenjen na temelju AGEs prisutne su više razine AEA u plazmi u odnosu na skupinu ispitanika s nižim rizikom.
5. Nije pronađena povezanost između razina 2-AG u plazmi i kategorija kardiovaskularnog rizika temeljenim na AGEs u ispitanika s predijabetesom.
6. Nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentracijama AEA i 2-AG u muškaraca i u žena.
7. Nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentracijama AEA i 2-AG u ovisnosti o vrijednosti sistoličkog arterijskog tlaka i ITM u ispitanika s predijabetesom.
8. Veća adherencija mediteranskoj prehrani u ukupnoj studijskoj populaciji bila je povezana s nižim plazmatskim koncentracijama AEA, dok takva povezanost nije utvrđena za 2-AG.

7. SAŽETAK

Uvod: Predijabetes, prijelazno stanje između normoglikemije i šećerne bolesti tipa 2, predstavlja sve značajniji javnozdravstveni i klinički izazov, osobito u kontekstu rastuće globalne prevalencije metaboličkih poremećaja. U podlozi patofiziologije predijabetesa nalaze se brojni međusobno isprepleteni mehanizmi, među kojima se osobito izdvajaju pojačana akumulacija krajnjih produkata glikacije (AGEs) te poremećaji u aktivnosti endokanabinoidnog sustava (ECS), koji su povezani s razvojem upale, oksidacijskog stresa i inzulinske rezistencije. Iako je mediteranski tip prehrane prepoznat kao jedan od najučinkovitijih prehranbenih obrazaca u očuvanju kardiometaboličkoga zdravlja, dosadašnja su istraživanja utjecaj prehrane na ECS i akumulaciju AGEs uglavnom razmatrala odvojeno. Slijedom navedenoga, cilj je ovoga istraživanja pridonijeti boljem razumijevanju međudjelovanja endokanabinoidnog sustava i akumulacije AGEs te uloge adherencije mediteranskom tipu prehrane u populaciji osoba s predijabetesom.

Ispitanici i postupci: Provedeno je presječno istraživanje na 178 ispitanika: 92 s predijabetesom i 86 zdravih kontrola, usklađenih prema dobi i spolu. Predijabetes je definiran prema posljednjim smjernicama Američkog dijabetičkog društva. Uz prikupljanje standardnih anamnestičkih podataka, učinjena su antropometrijska mjerenja, mjerenje arterijskog tlaka, određivanje akumulacije AGEs kožnom autofluorescencijom, laboratorijska obrada uzoraka venske krvi, određivanje plazmatskih koncentracija anandamida (AEA) i 2-arahidonoil glicerola (2-AG) te procjena adherencije mediteranskoj prehrani ispunjavanjem standardiziranog upitnika.

Rezultati: U bolesnika s predijabetesom zabilježene su značajno više plazmatske koncentracije AEA nego u zdravih kontrola podudarnih po dobi i spolu (47,2 (31,1–64,0) ng/mL vs. 34,2 (23,6–44,8) ng/mL; $P = 0,004$), dok se koncentracije 2-AG nisu razlikovale među skupinama. U skupini s predijabetesom AEA je pozitivno korelirao s vrijednostima AGEs-a ($r = 0,357$; $P = 0,002$), a ispitanici u višoj AGE Reader-procijenjenoj kategoriji kardiovaskularnog rizika imali su više razine AEA od ispitanika niže kategorije rizika. Adherencija mediteranskoj prehrani bila je povezana s nižim koncentracijama AEA (38,0 (20,3–51,9) ng/mL vs. 47,5 (27,7–51,8) ng/mL; $P = 0,038$), dok za 2-AG takva povezanost nije utvrđena.

Zaključak: Rezultati ovog istraživanja upućuju na to da je razina AEA, za razliku od 2-AG, povezana s predijabetesom, višim kardiovaskularnim rizikom procijenjenim na temelju AGEs te obrascima prehrane. Navedeni nalaz sugerira moguću ulogu AEA kao biomarkera ranih metaboličkih i kardiovaskularnih poremećaja u bolesnika s predijabetesom.

8. SUMMARY

PhD Thesis Title: Association of Endocannabinoids, Advanced Glycation End Products, and Adherence to the Mediterranean Diet in Prediabetes

Introduction: Prediabetes, a transitional state between normoglycemia and type 2 diabetes mellitus, is an increasingly important public health and clinical challenge, particularly in the context of the growing global prevalence of metabolic disorders. Prediabetes pathophysiology involves numerous interrelated mechanisms, among which increased accumulation of advanced glycation end products (AGEs) and disturbances in endocannabinoid system (ECS) activity stand out and are associated with inflammation, oxidative stress, and insulin resistance. Although the Mediterranean diet is recognized as one of the most effective dietary patterns for preserving cardiometabolic health, previous studies have mostly examined the effects of diet on the ECS and AGE accumulation separately. Accordingly, this study aimed to improve understanding of the interplay between the endocannabinoid system and AGE accumulation, as well as the role of adherence to the Mediterranean dietary pattern in individuals with prediabetes.

Subjects and methods: A cross-sectional study was conducted in 178 participants: 92 with prediabetes and 86 healthy controls matched for age and sex. Prediabetes was defined according to the latest guidelines of the American Diabetes Association. In addition to the collection of standard medical history data, anthropometric measurements, blood pressure measurement, assessment of AGE accumulation by skin autofluorescence, laboratory analysis of venous blood samples, determination of plasma concentrations of anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), and assessment of adherence to the Mediterranean diet using a standardized questionnaire were performed.

Results: Patients with prediabetes had significantly higher plasma AEA concentrations than age- and sex-matched healthy controls (47.2 (31.1–64.0) ng/mL vs. 34.2 (23.6–44.8) ng/mL; $P = 0.004$), whereas 2-AG concentrations did not differ between groups. In the prediabetes group, AEA positively correlated with AGE values ($r = 0.357$; $P = 0.002$), and participants in the higher AGE Reader-assessed cardiovascular risk category had higher AEA levels than those in the lower risk category. Adherence to the Mediterranean diet was associated with lower AEA concentrations (38.0 (20.3–51.9) ng/mL vs. 47.5 (27.7–51.8) ng/mL; $P = 0.038$), whereas no such association was found for 2-AG.

Conclusion: The results of this study indicate that AEA levels, unlike 2-AG, are associated with prediabetes, higher cardiovascular risk estimated on the basis of AGEs, and dietary

patterns. This finding suggests a possible role of AEA as a biomarker of early metabolic and cardiovascular disturbances in patients with prediabetes.

9. LITERATURA

1. American Diabetes Association Professional Practice Committee for Diabetes. 2. Diagnosis and classification of diabetes: standards of care in diabetes-2026. *Diabetes Care*. 2026;49:S27-49.
2. Unnikrishnan R, Shaw JE, Chan JCN, Wild SH, Peters AL, Orrange S i sur. Prediabetes. *Nat Rev Dis Primers*. 2025;11:49.
3. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*. 1979;28:1039-57.
4. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1997;20:1183-97.
5. Genuth S, Alberti KGMM, Bennett P, Buse J, DeFronzo R, Kahn R i sur. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26:3160-7.
6. World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2006 [citirano 8. studenog 2025.]. Dostupno na: <https://www.who.int/publications/i/item/definition-and-diagnosis-of-diabetes-mellitus-and-intermediate-hyperglycaemia>
7. World Health Organization. Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus: abbreviated report of a WHO consultation [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2011 [citirano 8. studenog 2025.]. Dostupno na: [https://www.who.int/publications/i/item/use-of-glycated-haemoglobin-\(-hba1c\)-in-diagnosis-of-diabetes-mellitus](https://www.who.int/publications/i/item/use-of-glycated-haemoglobin-(-hba1c)-in-diagnosis-of-diabetes-mellitus)
8. Zhang X, Gregg EW, Williamson DF, Barker LE, Thomas W, McKeever Bullard K i sur. A1C level and future risk of diabetes: a systematic review. *Diabetes Care*. 2010;33:1665-73.
9. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Lernmark A i sur. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2023;46:e151-99.
10. Klein KR, Walker CP, McFerren AL, Huffman H, Frohlich F, Buse JB. Carbohydrate intake prior to oral glucose tolerance testing. *J Endocr Soc*. 2021;5:bvab049.
11. Hostalek U. Global epidemiology of prediabetes - present and future perspectives. *Clin Diabetes Endocrinol*. 2019;5:5.

12. Yip WCY, Sequeira IR, Plank LD, Poppitt SD. Prevalence of pre-diabetes across ethnicities: a review of impaired fasting glucose (IFG) and impaired glucose tolerance (IGT) for classification of dysglycaemia. *Nutrients*. 2017;9:1273.
13. Sequeira IR, Poppitt SD. HbA1c as a marker of prediabetes: a reliable screening tool or not? *Insights Nutr Metabol*. 2017;1:21-9.
14. Barry E, Roberts S, Oke J, Vijayaraghavan S, Normansell R, Greenhalgh T. Efficacy and effectiveness of screen and treat policies in prevention of type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of screening tests and interventions. *BMJ*. 2017;356:i6538.
15. Herman WH, Ma Y, Uwaifo G, Haffner S, Kahn SE, Horton ES i sur. Differences in A1C by race and ethnicity among patients with impaired glucose tolerance in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes Care*. 2007;30:2453-7.
16. Knowler WC, Fowler SE, Hamman RF, Christophi CA, Hoffman HJ, Brenneman AT i sur. 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet*. 2009;374:1677-86.
17. Diabetes Prevention Program Research Group. HbA1c as a predictor of diabetes and as an outcome in the Diabetes Prevention Program: a randomized clinical trial. *Diabetes Care*. 2015;38:51-8.
18. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Global variation in diabetes diagnosis and prevalence based on fasting glucose and hemoglobin A1c. *Nat Med*. 2023;29:2885-901.
19. Sathish T, Khunti K, Venkat Narayan KM, Mohan V, Davies MJ, Yates T i sur. Effect of conventional lifestyle interventions on type 2 diabetes incidence by glucose-defined prediabetes phenotype: an individual participant data meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Care*. 2023;46:1903-7.
20. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 2. Diagnosis and classification of diabetes: standards of care in diabetes-2025. *Diabetes Care*. 2025;48:S27-49.
21. Diabetes Prevention Program Research Group. Long-term effects of lifestyle intervention or metformin on diabetes development and microvascular complications over 15-year follow-up: the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3:866-75.
22. Li G, Zhang P, Wang J, An Y, Gong Q, Gregg EW i sur. Cardiovascular mortality, all-cause mortality, and diabetes incidence after lifestyle intervention for people with impaired

- glucose tolerance in the Da Qing diabetes prevention study: a 23-year follow-up study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014;2:474-80.
23. Rooney MR, Fang M, Ogurtsova K, Ozkan B, Echouffo-Tcheugui JB, Boyko EJ i sur. Global prevalence of prediabetes. *Diabetes Care.* 2023;46:1388-94.
 24. Rooney MR, He JH, Salpea P, Genitsaridi I, Magliano DJ, Boyko EJ i sur. Global and regional prediabetes prevalence: updates for 2024 and projections for 2050. *Diabetes Care.* 2025;48:e142-4.
 25. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th edition [Internet]. Brussels: International Diabetes Federation; 2021 [citirano 8. studenog 2025.]. Dostupno na: <https://diabetesatlas.org/>
 26. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 11th edition [Internet]. Brussels: International Diabetes Federation; 2025 [citirano 4. lipnja 2026.]. Dostupno na: <https://diabetesatlas.org/>
 27. Malik VS, Willett WC, Hu FB. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9:13-27.
 28. Cheng YJ, Kanaya AM, Araneta MRG, Saydah SH, Kahn HS, Gregg EW i sur. Prevalence of diabetes by race and ethnicity in the United States, 2011-2016. *JAMA.* 2019;322:2389-98.
 29. Anjana RM, Deepa M, Pradeepa R, Mahanta J, Narain K, Das HK i sur. Prevalence of diabetes and prediabetes in 15 states of India: results from the ICMR-INDIAB population-based cross-sectional study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5:585-96.
 30. Yisahak SF, Beagley J, Hambleton IR, Narayan KM. Diabetes in North America and the Caribbean: an update. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;103:223-30.
 31. Acosta-Reyes J, Rodrigues Garrido DP, Vergara TA, Aschner P, Fraga CA, Vazquez-Fernandez A i sur. Finnish diabetes risk score (FINDRISC) for type 2 diabetes screening compared with the oral glucose tolerance test: a systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2025;229:112480.
 32. Atayoglu AT, Inanc N, Basmisirli E, Capar AG. Evaluation of the Finnish diabetes risk score (FINDRISC) for diabetes screening in Kayseri, Turkey. *Prim Care Diabetes.* 2020;14:488-93.
 33. Peralta HM, Costa Gil JE, Saleme AE. FINDRISC as screening for detection of prediabetes and unknown type 2 diabetes. *Medicina (B Aires).* 2024;84:1-10.

34. Richter B, Hemmingsen B, Metzendorf MI, Takwoingi Y. Development of type 2 diabetes mellitus in people with intermediate hyperglycaemia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;10:CD012661.
35. Tura A, Grespan E, Göbl CS, Koivula RW, Franks PW, Pearson ER i sur. Profiles of glucose metabolism in different prediabetes phenotypes, classified by fasting glycemia, 2-hour OGTT, glycated hemoglobin, and 1-hour OGTT: an IMI DIRECT study. *Diabetes*. 2021;70:2092-106.
36. Galaviz KI, Weber MB, Suvada KBS, Gujral UP, Wei J, Merchant R i sur. Interventions for reversing prediabetes: a systematic review and meta-analysis. *Am J Prev Med*. 2022;62:614-25.
37. Lazo-Porras M, Bernabe-Ortiz A, Ruiz-Alejos A, Smeeth L, Gilman RH, Checkley W i sur. Regression from prediabetes to normal glucose levels is more frequent than progression towards diabetes: the CRONICAS cohort study. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020;163:107829.
38. Rooney MR, Rawlings AM, Pankow JS, Echouffo Tcheugui JB, Coresh J, Richey Sharrett A. Risk of progression to diabetes among older adults with prediabetes. *JAMA Intern Med*. 2021;181:511-9.
39. Shang Y, Marseglia A, Fratiglioni L, Welmer AK, Wang R, Wang HX i sur. Natural history of prediabetes in older adults from a population-based longitudinal study. *J Intern Med*. 2019;286:326-40.
40. Gong Q, Zhang P, Wang J, Ma J, An Y, Chen Y i sur. Morbidity and mortality after lifestyle intervention for people with impaired glucose tolerance: 30-year results of the Da Qing Diabetes Prevention Outcome Study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7:452-61.
41. Wang Y, O'Neil A, Jiao Y, Wang L, Huang J, Lan Y i sur. Sex differences in the association between diabetes and risk of cardiovascular disease, cancer, and all-cause and cause-specific mortality: a systematic review and meta-analysis of 5,162,654 participants. *BMC Med*. 2019;17:136.
42. Schlesinger S, Neuenschwander M, Barbaresco J, Lang A, Maalmi H, Rathmann W i sur. Prediabetes and risk of mortality, diabetes-related complications and comorbidities: umbrella review of meta-analyses of prospective studies. *Diabetologia*. 2022;65:275-85.
43. Cai X, Liu X, Sun L, He Y, Zheng S, Zhang Y i sur. Prediabetes and the risk of heart failure: a meta-analysis. *Diabetes Obes Metab*. 2021;23:1746-53.

44. Rooney MR, Wallace AS, Echouffo Tcheugui JB, Fang M, Hu J, Lutsey PL i sur. Prediabetes is associated with elevated risk of clinical outcomes even without progression to diabetes. *Diabetologia*. 2025;68:357-66.
45. Ndumele CE, Rangaswami J, Chow SL, Neeland IJ, Tuttle KR, Khan SS i sur. Cardiovascular-kidney-metabolic health: a presidential advisory from the American Heart Association. *Circulation*. 2023;148:1606-35.
46. Colagiuri S, Lee CMY, Wong TY, Balkau B, Shaw JE, Borch-Johnsen K. Glycemic thresholds for diabetes-specific retinopathy: implications for diagnostic criteria for diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34:145-50.
47. Lamparter J, Raum P, Pfeiffer N, Peto T, Höhn E, Elflein H i sur. Prevalence and associations of diabetic retinopathy in a large cohort of prediabetic subjects: the Gutenberg health study. *J Diabetes Complicat*. 2014;28:482-7.
48. Kirthi V, Perumbalath A, Brown E, Nevitt S, Petropoulos IN, Burgess J. Prevalence of peripheral neuropathy in pre-diabetes: a systematic review. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2021;9:e002040.
49. Herder C, Roden M, Ziegler D. Novel insights into sensorimotor and cardiovascular autonomic neuropathy from recent-onset diabetes and population-based cohorts. *Trends Endocrinol Metab*. 2019;30:286-98.
50. Eleftheriadou A, Williams S, Nevitt S, Brown E, Roylance R, Wildin JPH i sur. The prevalence of cardiac autonomic neuropathy in prediabetes: a systematic review. *Diabetologia*. 2021;64:288-303.
51. Yu J, Lee KN, Kim HS, Han K, Lee SH. Cumulative effect of impaired fasting glucose on the risk of dementia in middle-aged and elderly people: a nationwide cohort study. *Sci Rep*. 2023;13:20600.
52. Xue M, Xu W, Ou YN, Cao XP, Tan MS, Tan L i sur. Diabetes mellitus and risks of cognitive impairment and dementia: a systematic review and meta-analysis of 144 prospective studies. *Ageing Res Rev*. 2019;55:100944.
53. Tong A, Wang X, Li F, Xu F, Li Q, Zhang F. Risk of depressive symptoms associated with impaired glucose metabolism, newly diagnosed diabetes, and previously diagnosed diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Acta Diabetol*. 2016;53:589-98.
54. Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E i sur. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. 2010;375:2215-22.

55. Warren B, Pankow JS, Matsushita K, Punjabi NM, Daya NR, Grams M i sur. Comparative prognostic performance of definitions of prediabetes: a prospective cohort analysis of the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5:34-42.
56. Eastwood SV, Tillin T, Sattar N, Forouhi NG, Hughes AD, Chaturvedi N. Associations between prediabetes, by three different diagnostic criteria, and incident CVD differ in South Asians and Europeans. *Diabetes Care.* 2015;38:2325-32.
57. Barnett AH, Eff C, Leslie RD, Pyke DA. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia.* 1981;20:87-93.
58. Spracklen CN, Horikoshi M, Jin Kim Y, Lin K, Bragg F, Moon S i sur. Identification of type 2 diabetes loci in 433,540 East Asian individuals. *Nature.* 2020;582:240-5.
59. Fuchsberger C, Flannick J, Teslovich TM, Mahajan A, Agarwala V, Gaulton KJ i sur. The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature.* 2016;536:41-7.
60. Suzuki K, Hatzikotoulas K, Southam L, Taylor HJ, Yin X, Lorenz KM i sur. Genetic drivers of heterogeneity in type 2 diabetes pathophysiology. *Nature.* 2024;627:347-57.
61. McCarthy M, Birney E. Personalized profiles for disease risk must capture all facets of health. *Nature.* 2021;597:175-7.
62. Chan JCN, Lim LL, Wareham NJ, Shaw JE, Orchard TJ, Zhan P i sur. The Lancet Commission on Diabetes: using data to transform diabetes care and patient lives. *Lancet.* 2021;396:2019-82.
63. Takeuchi T, Kubota T, Nakanishi Y, Tsugawa H, Suda W, Kwon ATJ i sur. Gut microbial carbohydrate metabolism contributes to insulin resistance. *Nature.* 2023;621:389-95.
64. Roden M, Shulman GI. The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature.* 2019;576:51-60.
65. Tabák AG, Carstensen M, Witte DR, Brunner EJ, Shipley MJ, Jokela M i sur. Adiponectin trajectories before type 2 diabetes diagnosis: Whitehall II study. *Diabetes Care.* 2012;35:2540-7.
66. Mastrototaro L, Roden M. Insulin resistance and insulin sensitizing agents. *Metabolism.* 2021;125:154892.
67. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev.* 2018;98:2133-223.
68. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet.* 2012;379:2279-90.

69. Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2003;46:3-19.
70. Tabák AG, Jokela M, Akbaraly TN, Brunner EJ, Kivimäki M, Witte DR. Trajectories of glycemia, insulin sensitivity and insulin secretion preceding the diagnosis of type 2 diabetes: the Whitehall II study. *Lancet*. 2009;373:2215-21.
71. Mason CC, Hanson RL, Knowler WC. Progression to type 2 diabetes characterized by moderate then rapid glucose increases. *Diabetes*. 2007;56:2054-61.
72. Ferrannini E, Nannipieri M, Williams K, Gonzales C, Haffner SM, Stern MP. Mode of onset of type 2 diabetes from normal or impaired glucose tolerance. *Diabetes*. 2004;53:160-5.
73. Esser N, Utzschneider KM, Kahn SE. Early beta cell dysfunction vs insulin hypersecretion as the primary event in the pathogenesis of dysglycaemia. *Diabetologia*. 2020;63:2007-21.
74. Wagner R, Heni M, Tabak AG, Machann J, Schick F, Randrianarisoa E i sur. Pathophysiology-based subphenotyping of individuals at elevated risk for type 2 diabetes. *Nat Med*. 2021;27:49-57.
75. Zaharia OP, Strassburger K, Strom A, Bönhof GJ, Karusheva Y, Antoniou S i sur. Risk of diabetes-associated diseases in subgroups of patients with recent-onset diabetes: a 5-year follow-up study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2019;7:684-94.
76. Scherer PE. The many secret lives of adipocytes: implications for diabetes. *Diabetologia*. 2019;62:223-32.
77. Xourafa G, Korbmacher M, Roden M. Inter-organ crosstalk during development and progression of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2024;20:27-49.
78. Edwards CM, Cusi K. Prediabetes: a worldwide epidemic. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2016;45:751-64.
79. Nauck MA, Müller TD. Incretin hormones and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2023;66:1780-95.
80. Campbell MD, Sathish T, Zimmet PZ, Thankappan KR, Oldenburg B, Owens DR i sur. Benefit of lifestyle-based T2DM prevention is influenced by prediabetes phenotype. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16:395-400.
81. Thirunavukkarasu S, Taylor R, Khunti K, Tapp RJ, Raben A, Zhu R i sur. Low-calorie diets for people with isolated impaired fasting glucose. *Commun Med (Lond)*. 2024;4:35.

82. Weber MB, Ranjani H, Staimez LR, Anjana RM, Ali MK, Narayan KM i sur. The stepwise approach to diabetes prevention: results from the D-CLIP randomized controlled trial. *Diabetes Care*. 2016;39:1760-7.
83. Balk EM, Earley A, Raman G, Avendano EA, Pittas AG, Remington PL. Combined diet and physical activity promotion programs to prevent type 2 diabetes among persons at increased risk: a systematic review for the Community Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2015;163:437-51.
84. Yamaoka K, Nemoto A, Tango T. Comparison of the effectiveness of lifestyle modification with other treatments on the incidence of type 2 diabetes in people at high risk: a network meta-analysis. *Nutrients*. 2019;11:1373.
85. Sheng Z, Cao JY, Pang YC, Xu HC, Chen JW, Yuan JH i sur. Effects of lifestyle modification and anti-diabetic medicine on prediabetes progress: a systematic review and meta-analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:455.
86. Uusitupa M, Khan TA, Viguiliouk E, Kahleova H, Rivellese AA, Hermansen K i sur. Prevention of type 2 diabetes by lifestyle changes: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients*. 2019;11:2611.
87. Galaviz KI, Weber MB, Straus A, Haw JS, Narayan KMV, Ali MK. Global diabetes prevention interventions: a systematic review and network meta-analysis of the real-world impact on incidence, weight, and glucose. *Diabetes Care*. 2018;41:1526-34.
88. Abdul-Ghani MA, Tripathy D, DeFronzo RA. Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care*. 2006;29:1130-9.
89. Echouffo-Tcheugui JB, Selvin E. Prediabetes and what it means: the epidemiological evidence. *Annu Rev Public Health*. 2021;42:59-77.
90. Kanat M, Mari A, Norton L, Winnier D, DeFronzo RA, Jenkinson C i sur. Distinct β -cell defects in impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance. *Diabetes*. 2012;61:447-53.
91. Chakkalakal RJ, Galaviz KI, Thirunavukkarasu S, Shah MK, Narayan KMV. Test and treat for prediabetes: a review of the health effects of prediabetes and the role of screening and prevention. *Annu Rev Public Health*. 2024;45:151-67.
92. Perreault L, Pan Q, Schroeder EB, Kalyani RR, Bray GA, Dagogo-Jack S i sur. Regression from prediabetes to normal glucose regulation and prevalence of microvascular disease in

- the Diabetes Prevention Program Outcomes Study (DPPOS). *Diabetes Care*. 2019;42:1809-15.
93. Shen XX, Wang JP, Chen YY, An YL, Gong QH, Zhang B i sur. Subjects with impaired glucose tolerance returned to normal glucose status for six years had lower long-term risk of diabetes: 20 years follow up of Daqing diabetes prevention study. *Chinese J Intern Med*. 2019;58:372-6.
94. Hughes A, Khan T, Kirley K, Moin T, Mainous A, Sachdev N i sur. Metformin prescription rates for patients with prediabetes. *J Am Board Fam Med*. 2022;35:821-6.
95. Diabetes Prevention Program Research Group. Long-term effects of metformin on diabetes prevention: identification of subgroups that benefited most in the Diabetes Prevention Program and Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Diabetes Care*. 2019;42:601-8.
96. Moin T, Schmittziel JA, Flory JH, Yeh J, Karter AJ, Kruger LE i sur. Review of metformin use for type 2 diabetes prevention. *Am J Prev Med*. 2018;55:565-74.
97. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 3. Prevention or delay of diabetes and associated comorbidities: standards of care in diabetes-2025. *Diabetes Care*. 2025;48:S50-8.
98. Echouffo-Tcheugui JB, Perreault L, Ji L, Dagogo-Jack S. Diagnosis and management of prediabetes: a review. *JAMA*. 2023;329:1206-16.
99. Knowler WC, Hamman RF, Edelstein SL, Barrett-Connor E, Ehrmann DA, Walker EA i sur. Prevention of type 2 diabetes with troglitazone in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes*. 2005;54:1150-6.
100. DeFronzo RA, Tripathy D, Schwenke DC, Banerji M, Bray GA, Buchanan TA i sur. Pioglitazone for diabetes prevention in impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*. 2011;364:1104-15.
101. DeFronzo RA, Tripathy D, Schwenke DC, Banerji M, Bray GA, Buchanan TA i sur. Prevention of diabetes with pioglitazone in ACT NOW: physiologic correlates. *Diabetes*. 2013;62:3920-6.
102. Luo Y, Wang H, Zhou X, Chang C, Chen W, Guo X i sur. A randomized controlled clinical trial of lifestyle intervention and pioglitazone for normalization of glucose status in Chinese with prediabetes. *J Diabetes Res*. 2022;2022:2971382.

103. Gerstein HC, Yusuf S, Bosch J, Pogue J, Sheridan P, Dinccag N i sur. Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2006;368:1096-105.
104. Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet*. 2002;359:2072-7.
105. Gerstein HC, Coleman RL, Scott CAB, Xu S, Tuomilehto J, Rydén L i sur. Impact of acarbose on incident diabetes and regression to normoglycemia in people with coronary heart disease and impaired glucose tolerance: insights from the ACE trial. *Diabetes Care*. 2020;43:2242-7.
106. Biswas K, Reddy VB, Seshadri K, Kapoor N, Dharmalingam M, Anthuvan T. Position of SGLT2i in prediabetes: a systematic review of literature. *J Diabetol*. 2025;16:102-14.
107. Pi-Sunyer X, Astrup A, Fujioka K, Greenway F, Halpern A, Krempf M i sur. A randomized, controlled trial of 3.0 mg of liraglutide in weight management. *N Engl J Med*. 2015;373:11-22.
108. Wilding JPH, Batterham RL, Calanna S, Davies M, Van Gaal LF, Lingvay I i sur. Once-weekly semaglutide in adults with overweight or obesity. *N Engl J Med*. 2021;384:989-1002.
109. Jastreboff AM, le Roux CW, Stefanski A, Aronne LJ, Halpern B, Wharton S i sur. Tirzepatide for obesity treatment and diabetes prevention. *N Engl J Med*. 2025;392:958-71.
110. Wang W, Wei R, Huang Z, Luo J, Pan Q, Guo L. Effects of treatment with glucagon-like peptide-1 receptor agonist on prediabetes with overweight/obesity: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab Res Rev*. 2023;39:e3680.
111. Mozaffarian D. GLP-1 agonists for obesity - a new recipe for success? *JAMA*. 2024;331:1007-8.
112. Pittas AG, Kawahara T, Jorde R, Dawson-Hughes B, Vickery EM, Angellotti E i sur. Vitamin D and risk for type 2 diabetes in people with prediabetes: a systematic review and meta-analysis of individual participant data from 3 randomized clinical trials. *Ann Intern Med*. 2023;176:355-63.
113. Borges-Canha M, Neves JS, Silva MM, Mendonça F, Moreno T, Ribeiro S i sur. Prediabetes remission after bariatric surgery: a 4-years follow-up study. *BMC Endocr Disord*. 2024;24:7.

114. Stenberg E, Rask E, Szabo E, Näslund I, Ottosson J. The effect of laparoscopic gastric bypass surgery on insulin resistance and glycosylated hemoglobin A1c: a 2-year follow-up study. *Obes Surg.* 2020;30:3489-95.
115. Mousavi SS, Namayandeh SM, Fallahzadeh H, Rahmanian M, Mollahosseini M. Comparing the effectiveness of metformin with lifestyle modification for the primary prevention of type II diabetes: a systematic review and meta-analysis. *BMC Endocr Disord.* 2023;23:198.
116. Haw JS, Galaviz KI, Straus AN, Kowalski AJ, Magee MJ, Weber MB i sur. Long-term sustainability of diabetes prevention approaches: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *JAMA Intern Med.* 2017;177:1808-17.
117. Glechner A, Keuchel L, Affengruber L, Titscher V, Sommer I, Matyas N i sur. Effects of lifestyle changes on adults with prediabetes: a systematic review and meta-analysis. *Prim Care Diabetes.* 2018;12:393-408.
118. Davidson MB. Metformin should not be used to treat prediabetes. *Diabetes Care.* 2020;43:1983-7.
119. Sergi D, Boulestin H, Campbell FM, Williams LM. The role of dietary advanced glycation end products in metabolic dysfunction. *Mol Nutr Food Res.* 2021;65:e1900934.
120. Reddy VP, Beyaz A. Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discov Today.* 2006;11:646-54.
121. Goldberg T, Cai W, Peppia M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J i sur. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc.* 2004;104:1287-91.
122. Palimeri S, Palioura E, Diamanti-Kandarakis E. Current perspectives on the health risks associated with the consumption of advanced glycation end products: recommendations for dietary management. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2015;8:415-26.
123. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.* 2014;2:411-29.
124. Scheijen LJJM, Clevers E, Engelen L, Dagnelie PC, Brouns F, Stehouwer CDA i sur. Analysis of advanced glycation endproducts in selected food items by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: presentation of a dietary AGE database. *Food Chem.* 2016;190:1145-50.

125. Uribarri J, Peppas M, Cai W, Goldberg T, Lu M, He C i sur. Restriction of dietary glycotoxins reduces excessive advanced glycation end products in renal failure patients. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:728-31.
126. Baye E, de Courten MP, Walker K, Ranasinha S, Earnest A, Forbes JM i sur. Effect of dietary advanced glycation end products on inflammation and cardiovascular risks in healthy overweight adults: a randomised crossover trial. *Sci Rep.* 2017;7:4123.
127. Cahn F, Burd J, Ignatz K, Mishra S. Measurement of lens autofluorescence can distinguish subjects with diabetes from those without. *J Diabetes Sci Technol.* 2014;8:43-9.
128. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2014;18:1-14.
129. Yanagisawa K, Makita Z, Shiroshita K, Ueda T, Fusegawa T, Kuwajima S i sur. Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urine of diabetic patients. *Metabolism.* 1998;47:1348-53.
130. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PHN, Links TP, Jager JJ, Alderson NL i sur. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia.* 2004;47:1324-30.
131. Meerwaldt R, Links T, Graaff R, Thorpe SR, Baynes JW, Hartog J i sur. Simple noninvasive measurement of skin autofluorescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1043:290-8.
132. Lutgers HL, Graaff R, Links TP, Ubink-Veltmaat LJ, Bilo HJ, Gans RO i sur. Skin autofluorescence as a noninvasive marker of vascular damage in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2006;29:2654-9.
133. Koetsier M, Lutgers HL, de Jonge C, Links TP, Smit AJ, Graaff R. Reference values of skin autofluorescence. *Diabetes Technol Ther.* 2010;12:399-403.
134. Fotheringham AK, Gallo LA, Borg DJ, Forbes JM. Advanced glycation end products (AGEs) and chronic kidney disease: does the modern diet AGE the kidney? *Nutrients.* 2022;14:2675.
135. Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005;67:3-21.
136. Bongarzone S, Savickas V, Luzi F, Gee AD. Targeting the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE): a medicinal chemistry perspective. *J Med Chem.* 2017;60:7213-32.
137. Reddy VP, Aryal P, Darkwah EK. Advanced glycation end products in health and disease. *Microorganisms.* 2022;10:1848.

138. Lee EJ, Park JH. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE), its ligands, and soluble RAGE: potential biomarkers for diagnosis and therapeutic targets for human renal diseases. *Genomics Inform.* 2013;11:224-9.
139. Aronson D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. *J Hypertens.* 2003;21:3-12.
140. Liu CY, Huang QF, Cheng YB, Guo QH, Chen Q, Li Y i sur. A comparative study on skin and plasma advanced glycation end products and their associations with arterial stiffness. *Pulse (Basel).* 2017;4:208-18.
141. Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res.* 2004;63:582-92.
142. Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules.* 2015;5:194-222.
143. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13:633-43.
144. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature.* 2017;542:177-85.
145. Zick Y. Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci STKE.* 2005;268:pe4.
146. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM i sur. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med.* 2005;11:191-8.
147. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature.* 2006;440:944-8.
148. Pinto-Junior DC, Silva KS, Michalani ML, Yonamine CY, Esteves JV, Fabre NT i sur. Advanced glycation end products-induced insulin resistance involves repression of skeletal muscle GLUT4 expression. *Sci Rep.* 2018;8:8109.
149. Lin N, Zhang H, Su Q. Advanced glycation end-products induce injury to pancreatic beta cells through oxidative stress. *Diabetes Metab.* 2012;38:250-7.
150. Vlassara H, Uribarri J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? *Curr Diab Rep.* 2014;14:453.
151. Lim M, Park L, Shin G, Hong H, Kang I, Park Y. Induction of apoptosis of beta cells of the pancreas by advanced glycation end-products, important mediators of chronic complications of diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1150:311-5.

152. Shu T, Zhu Y, Wang H, Lin Y, Ma Z, Han X. AGEs decrease insulin synthesis in pancreatic β -cell by repressing Pdx-1 protein expression at the post-translational level. *PLoS One*. 2011;6:e1878.
153. Cordova R, Knaze V, Viallon V, Rust P, Schalkwijk CG, Weiderpass E i sur. Dietary intake of advanced glycation end products (AGEs) and changes in body weight in European adults. *Eur J Nutr*. 2020;59:2893-904.
154. Uribarri J, Cai W, Ramdas M, Goodman S, Pyzik R, Chen X i sur. Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes: potential role of AGER1 and SIRT1. *Diabetes Care*. 2011;34:1610-6.
155. Bonen A. PGC-1 α -induced improvements in skeletal muscle metabolism and insulin sensitivity. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2009;34:307-14.
156. Sergi D, Williams LM. Potential relationship between dietary long-chain saturated fatty acids and hypothalamic dysfunction in obesity. *Nutr Rev*. 2020;78:261-77.
157. Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, Byun J, Morton GJ, Vivekanandan-Giri A i sur. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296:E1003-12.
158. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 2008;135:61-73.
159. Zuardi AW. History of cannabis as a medicine: a review. *Braz J Psychiatry*. 2006;28:153-7.
160. Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 1988;34:605-13.
161. Crocq MA. History of cannabis and the endocannabinoid system. *Dialogues Clin Neurosci*. 2020;22:223-8.
162. Rock EM, Parker LA. Constituents of Cannabis sativa. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1264:1-13.
163. Kicman A, Toczek M. The effects of cannabidiol, a non-intoxicating compound of cannabis, on the cardiovascular system in health and disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21:6740.
164. Li H, Liu Y, Tian D, Tian L, Ju X, Qi L i sur. Overview of cannabidiol (CBD) and its analogues: structures, biological activities, and neuroprotective mechanisms in epilepsy and Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*. 2020;192:112163.
165. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993;365:61-5.

166. Aloisio Caruso E, De Nunzio V, Tutino V, Notarnicola M. The endocannabinoid system: implications in gastrointestinal physiology and pathology. *Int J Mol Sci.* 2025;26:1306.
167. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G i sur. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 1992;258:1946-9.
168. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K i sur. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;215:89-97.
169. Pertwee RG. Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Curr Med Chem.* 2010;17:1360-81.
170. Riquelme-Sandoval A, de Sá-Ferreira CO, Miyakoshi LM, Hedin-Pereira C. New insights into peptide cannabinoids: structure, biosynthesis and signaling. *Front Pharmacol.* 2020;11:596572.
171. Zelasko S, Arnold WR, Das A. Endocannabinoid metabolism by cytochrome P450 monooxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2015;116-117:112-23.
172. Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther.* 1997;74:129-80.
173. Howlett AC, Mukhopadhyay S. Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem Phys Lipids.* 2000;108:53-70.
174. Staiano RI, Loffredo S, Borriello F, Iannotti FA, Piscitelli F, Orlando P i sur. Human lung-resident macrophages express CB1 and CB2 receptors whose activation inhibits the release of angiogenic and lymphangiogenic factors. *J Leukoc Biol.* 2016;99:531-40.
175. Christofides A, Konstantinidou E, Jani C, Boussiotis VA. The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses. *Metabolism.* 2021;114:154338.
176. Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR i sur. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:1932-6.
177. Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P i sur. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem.* 1995;232:54-61.
178. Klein TW. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:400-11.

179. Fakhfouri G, Ahmadiani A, Rahimian R, Grolla AA, Moradi F, Haeri A. WIN55212-2 attenuates amyloid-beta-induced neuroinflammation in rats through activation of cannabinoid receptors and PPAR- γ pathway. *Neuropharmacology*. 2012;3:653-66.
180. Scuderi C, Steardo L, Esposito G. Cannabidiol promotes amyloid precursor protein ubiquitination and reduction of beta amyloid expression in SHSY5YAPP+ cells through PPAR γ involvement. *Phytother Res*. 2014;28:1007-13.
181. Pistis M, Melis M. From surface to nuclear receptors: the endocannabinoid family extends its assets. *Curr Med Chem*. 2010;17:1450-67.
182. Bouaboula M, Hilairat S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P. Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol*. 2005;517:174-81.
183. Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*. 2000;405:421-4.
184. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR i sur. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB $_1$ and CB $_2$. *Pharmacol Rev*. 2010;62:588-631.
185. Gruden G, Barutta F, Kunos G, Pacher P. Role of the endocannabinoid system in diabetes and diabetic complications. *Br J Pharmacol*. 2016;173:1116-27.
186. Di Marzo V. The endocannabinoid system in obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2008;51:1356-67.
187. Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervinho C i sur. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:3171-80.
188. Perwitz N, Fasshauer M, Klein J. Cannabinoid receptor signaling directly inhibits thermogenesis and alters expression of adiponectin and visfatin. *Horm Metab Res*. 2006;38:356-8.
189. Ge Q, Maury E, Rycken L, Gérard J, Noël L, Detry R i sur. Endocannabinoids regulate adipokine production and the immune balance of omental adipose tissue in human obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37:874-80.
190. Silvestri C, Di Marzo V. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metab*. 2013;17:475-90.

191. Boon MR, Kooijman S, van Dam AD, Pelgrom LR, Berbée JF, Visseren CA i sur. Peripheral cannabinoid 1 receptor blockade activates brown adipose tissue and diminishes dyslipidemia and obesity. *FASEB J*. 2014;28:5361-75.
192. Kunos G, Tam J. The case for peripheral CB1 receptor blockade in the treatment of visceral obesity and its cardiometabolic complications. *Br J Pharmacol*. 2011;163:1423-31.
193. Liu J, Zhou L, Xiong K, Godlewski G, Mukhopadhyay B, Tam J i sur. Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via inhibition of insulin signaling and clearance in mice. *Gastroenterology*. 2012;142:1218-28.
194. Cinar R, Godlewski G, Liu J, Tam J, Jourdan T, Mukhopadhyay B i sur. Hepatic cannabinoid-1 receptors mediate diet-induced insulin resistance by increasing de novo synthesis of long-chain ceramides. *Hepatology*. 2014;59:143-53.
195. Deveaux V, Cadoudal T, Ichigotani Y, Teixeira-Clerc F, Louvet A, Manin S i sur. Cannabinoid CB2 receptor potentiates obesity-associated inflammation, insulin resistance and hepatic steatosis. *PLoS One*. 2009;4:e5844.
196. Rohrbach K, Thomas MA, Glick S, Fung EN, Wang V, Watson L i sur. Ibipinabant attenuates β -cell loss in male Zucker diabetic fatty rats independently of its effects on body weight. *Diabetes Obes Metab*. 2012;14:555-64.
197. Jourdan T, Godlewski G, Cinar R, Bertola A, Szanda G, Liu J i sur. Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes. *Nat Med*. 2013;19:1132-40.
198. Sierra S, Luquin N, Navarro-Otano J. The endocannabinoid system in cardiovascular function: novel insights and clinical implications. *Clin Auton Res*. 2018;28:35-52.
199. Dujic G, Kumric M, Vrdoljak J, Dujic Z, Bozic J. Chronic effects of oral cannabidiol delivery on 24-h ambulatory blood pressure in patients with hypertension (HYPER-H21-4): a randomized, placebo-controlled, and crossover study. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2024;9:979-89.
200. Kumric M, Dujic G, Vrdoljak J, Svagusa K, Kurir TT, Supe-Domic D i sur. CBD supplementation reduces arterial blood pressure via modulation of the sympatho-chromaffin system: a substudy from the HYPER-H21-4 trial. *Biomed Pharmacother*. 2023;160:114387.
201. Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup A. Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2007;370:1706-13.

202. Tam J, Vemuri VK, Liu J, Bátkai S, Mukhopadhyay B, Godlewski G i sur. Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *J Clin Invest.* 2010;120:2953-66.
203. Tam J, Cinar R, Liu J, Godlewski G, Wesley D, Jourdan T i sur. Peripheral cannabinoid-1 receptor inverse agonism reduces obesity by reversing leptin resistance. *Cell Metab.* 2012;16:167-79.
204. Jourdan T, Szanda G, Cinar R, Godlewski G, Holovac DJ, Park JK i sur. Developmental role of macrophage cannabinoid-1 receptor signaling in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2017;66:994-1007.
205. Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R i sur. The diet and 15-year death rate in the Seven Countries Study. *Am J Epidemiol.* 1986;124:903-15.
206. Guasch-Ferre M, Willett WC. The Mediterranean diet and health: a comprehensive overview. *J Intern Med.* 2021;290:549-66.
207. Willett WC, Sacks F, Trichopoulos A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E i sur. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr.* 1995;61:1402S-06S.
208. Davis C, Bryan J, Hodgson J, Murphy K. Definition of the Mediterranean diet; a literature review. *Nutrients.* 2015;7:9139-53.
209. Sikalidis AK, Kelleher AH, Kristo AS. Mediterranean diet. *Encyclopedia.* 2021;1:371-87.
210. Fung TT, Rexrode KM, Mantzoros CS, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Mediterranean diet and incidence of and mortality from coronary heart disease and stroke in women. *Circulation.* 2009;119:1093-100.
211. Sotos-Prieto M, Bhupathiraju SN, Mattei J, Fung TT, Li Y, Pan A i sur. Changes in diet quality scores and risk of cardiovascular disease among US men and women. *Circulation.* 2015;132:2212-9.
212. Dinu M, Pagliai G, Casini A, Sofi F. Mediterranean diet and multiple health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of observational studies and randomised trials. *Eur J Clin Nutr.* 2018;72:30-43.
213. Maiorino MI, Bellastella G, Petrizzo M, Scappaticcio L, Giugliano D, Esposito K. Mediterranean diet cools down the inflammatory milieu in type 2 diabetes: the MÉDITA randomized controlled trial. *Endocrine.* 2016;54:634-41.
214. Esposito K, Maiorino MI, Ciotola M, Scognamiglio P, Gicchino M, Petrizzo M i sur. Effects of a mediterranean-style diet on the need for antihyperglycemic drug therapy in

- patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2009;151:306-14.
215. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F i sur. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts. *N Engl J Med.* 2018;378:e34.
216. Jannasch F, Kröger J, Schulze MB. Dietary patterns and type 2 diabetes: a systematic literature review and meta-analysis of prospective studies. *J Nutr.* 2017;147:1174-82.
217. Koloverou E, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohou C, Georgousopoulou EN, Grekas A i sur. Adherence to Mediterranean diet and 10-year incidence (2002-2012) of diabetes: correlations with inflammatory and oxidative stress biomarkers in the ATTICA cohort study. *Diabetes Metab Res Rev.* 2015;32:73-81.
218. Esposito K, Maiorino MI, Bellastella G, Chiodini P, Panagiotakos D, Giugliano D. A journey into a Mediterranean diet and type 2 diabetes: a systematic review with meta-analyses. *BMJ Open.* 2015;5:e008222.
219. McEvoy JW, McCarthy CP, Bruno RM, Brouwers S, Canavan D, Ceconi C i sur. 2024 ESC guidelines for the management of elevated blood pressure and hypertension. *Eur Heart J.* 2024;45:3912-4018.
220. Marendić M, Polić N, Matek H, Oršulić L, Polašek O, Kolčić I i sur. Mediterranean diet assessment challenges: validation of the Croatian version of the 14-item Mediterranean diet serving score questionnaire. *PLoS One.* 2021;16:e0247269.
221. Nogueiras R, Diaz-Arteaga A, Lockie SH, Velasquez DA, Tschop J, Lopez M i sur. The endocannabinoid system: role in glucose and energy metabolism. *Pharmacol Res.* 2009;60:93-8.
222. Moreno E, Cavic M, Canela EI. Functional fine-tuning of metabolic pathways by the endocannabinoid system-implications for health and disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22:3661.
223. Nagappan A, Shin J, Jung MH. Role of cannabinoid receptor type 1 in insulin resistance and its biological implications. *Int J Mol Sci.* 2019;20:2109.
224. Quercioli A, Pataky Z, Vincenti G, Makoundou V, Di Marzo V, Montecucco F i sur. Elevated endocannabinoid plasma levels are associated with coronary circulatory dysfunction in obesity. *Eur Heart J.* 2011;32:1369-78.
225. Kahn S, Hull R, Utzschneider K. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 2006;444:840-6.

226. Matias I, Wang JW, Schiano Moriello A, Nieves A, Woodward DF, Di Marzo V. Changes in endocannabinoid and palmitoylethanolamide levels in eye tissues of patients with diabetic retinopathy and age-related macular degeneration. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006;75:413-8.
227. Despres JP, Golay A, Sjostrom L (Rimonabant in Obesity-Lipids Study Group). Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *N Engl J Med*. 2005;353:2121-34.
228. Pi-Sunyer FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J, RIO-North America Study Group. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006;295:761-75.
229. Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rossner S, RIO-Europe Study Group. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet*. 2005;365:1389-97.
230. Scheen AJ, Finer N, Hollander P, Jensen MD, Van Gaal LF, RIO-Diabetes Study Group. Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Lancet*. 2006;368:1660-72.
231. Di Marzo V, Stella N, Zimmer A. Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16:30-42.
232. Maccarrone M, Gasperi V, Catani MV, Diep TA, Dainese E, Hansen HS i sur. The endocannabinoid system and its relevance for nutrition. *Annu Rev Nutr*. 2010;30:423-40.
233. Soldevila-Domenech N, Pastor A, Sala-Vila A, Lázaro I, Boronat A, Muñoz D i sur. Sex differences in endocannabinoids during 3 years of Mediterranean diet intervention: association with insulin resistance and weight loss in a population with metabolic syndrome. *Front Nutr*. 2022;9:1076677.
234. Annuzzi G, Piscitelli F, Di Marino L, Patti L, Giacco R, Costabile G i sur. Differential alterations of the concentrations of endocannabinoids and related lipids in the subcutaneous adipose tissue of obese diabetic patients. *Lipids Health Dis*. 2010;9:43.
235. Liu J, Zhou L, Xiong K, Godlewski G, Mukhopadhyay B, Tam J i sur. Hepatic cannabinoid receptor-1 mediates diet-induced insulin resistance via impaired insulin signalling and clearance in mice. *Gastroenterology*. 2012;142:1218-28.

236. Tagliamonte S, Laiola M, Ferracane R, Vitale M, Gallo MA, Meslier V i sur. Mediterranean diet consumption affects the endocannabinoid system in overweight and obese subjects: possible links with gut microbiome, insulin resistance and inflammation. *Eur J Nutr.* 2021;60:3703-16.
237. Yang HM, Kim J, Kim BK, Seo HJ, Kim JY, Lee JE i sur. Resistin regulates inflammation and insulin resistance in humans via the endocannabinoid system. *Research.* 2024;7:0326.
238. Lee J, Yun JS, Ko SH. Advanced glycation end-products and vascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Nutrients.* 2022;14:3086.
239. Rajesh M, Bátкаи S, Kechrid M, Mukhopadhyay P, Lee WS, Horváth B i sur. Cannabinoid 1 receptor promotes cardiac dysfunction, oxidative stress, inflammation, and fibrosis in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes.* 2012;61:716-27.
240. Liu J, Pan S, Wang X, Liu Z, Zhang Y. Role of advanced glycation end products in diabetic vascular injury: molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Eur J Med Res.* 2023;28:553.
241. Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules.* 2015;5:194-222.
242. Lu X, Ma R, Zhan J, Pan X, Liu C, Zhang S i sur. Effect of dietary intake of advanced glycation end products on biomarkers of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2025;65:5277-86.
243. Birukov A, Cuadrat R, Polemiti E, Eichelmann F, Schulze MB. Skin autofluorescence-measured advanced glycation end-products associate with vascular stiffness: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol.* 2021;20:110.
244. Teichert T, Hellwig A, Peßler A, Hellwig M, Vossoughi M, Sugiri D i sur. Association between advanced glycation end products and impaired fasting glucose: results from the SALIA study. *PLoS One.* 2015;10:e0128293.
245. Müller T, Demizieux L, Troy-Fioramonti S, Grest J, Pais de Barros JP, Berger H i sur. Overactivation of the endocannabinoid system alters the antilipolytic action of insulin in mouse adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2017;313:E26-36.
246. Kumric M, Dujic G, Vrdoljak J, Supe-Domic D, Bilopavlovic N, Dolic K i sur. Effects of CBD supplementation on ambulatory blood pressure and serum urotensin-II concentrations in Caucasian patients with essential hypertension: a sub-analysis of the HYPER-H21-4 trial. *Biomed Pharmacother.* 2023;164:115016.

247. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC i sur. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 1994;372:686-91.
248. Rossi A, Di Filippo C, Rossi F, D'Amico M. Mediterranean diet modulates the endocannabinoid system in overweight and obese subjects: a randomised trial. *Nutrients*. 2021;13:3169.
249. Fernández-Iglesias A, Pajuelo D, Quesada H, Díaz S, Bladé C, Arola L i sur. Grape seed proanthocyanidin extract improves the hepatic glutathione metabolism in obese Zucker rats. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58:727-37.
250. Cani PD, Plovier H, Van Hul M, Geurts L, Delzenne NM, Druart C i sur. Endocannabinoids at the crossroads between the gut microbiota and host metabolism. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12:133-43.
251. Artmann A, Petersen G, Hellgren LI, Boberg J, Skonberg C, Nellemann C i sur. Influence of dietary fatty acids on endocannabinoid and N-acyl ethanolamine levels in rat brain, liver and small intestine. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1781:200-12.
252. Richard C, Lewis ED, Field CJ. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiometabolic risk in children and adolescents. *Nutrients*. 2016;8:329.

OSOBNİ PODATCI

Ime i prezime: Marko Grahovac

Datum i mjesto rođenja: 2. listopada 1994. godine, Split, Republika Hrvatska

E-mail: mgrahovac.st@gmail.com

OBRAZOVANJE

- 2013. – 2019. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, smjer doktor medicine
- 2009. – 2013. III Gimnazija (Prirodoslovno-matematička) Split
- 2001. – 2009. Osnovna škola Spinut, Split

RADNO ISKUSTVO

- 11/2024. – danas: Specijalizant endokrinologije i diabetologije, Zavod za endokrinologiju, diabetologiju i bolesti metabolizma, Klinički bolnički centar Split
- 01/2020. – 11/2024: Asistent na Zavodu za temeljnu i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Splitu
- 09/2019. – 01.2020: Dom zdravlja Splitsko dalmatinske županije, ordinacije primarne zdravstvene zaštite

OSTALE AKTIVNOSTI

- 2024. – danas: Član Odbora za unaprjeđenje kvalitete Medicinskog fakulteta u Splitu
- 2024. – danas: Član Povjerenstva za nastavu Medicinskog fakulteta u Splitu
- 2024. – danas: Član Hrvatskog endokrinološkog društva
- 2024. – dana: član Hrvatskog društva za dijabetes i bolesti metabolizma
- 2020. – danas: Član Hrvatskog društva farmakologa
- 2022. – 2024: Predstavnik studenata poslijediplomskih studija u Fakultetskom vijeću Medicinskog fakulteta u Splitu
- 2018. – 2019: Član Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Splitu

TEČAJEVI I KONFERENCIJE

- svibanj 2026. – Tečaj trajne medicinske izobrazbe 2. kategorije „Dijabetes 24/7“, usmeno izlaganje
- Travanj 2026. - 98. Dani dijabetologa u organizaciji Hrvatskog društva za dijabetes i bolesti metabolizma, usmeno izlaganje
- Veljača 2026. - 12. Hrvatski endokrinološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem
- Studeni 2025. - 97. Dani dijabetologa u organizaciji Hrvatskog društva za dijabetes i bolesti metabolizma
- Rujan 2025. - Croatian Summer School of Endocrinology, usmeno izlaganje
- Ožujak 2025. - Tečaj trajne medicinske izobrazbe 1. kategorije "3D - Dijabetes, debljina i dislipidemija", usmeno izlaganje
- Ožujak 2025. - 12. Hrvatski endokrinološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem
- Lipanj 2024. - 9th European Congress of Pharmacology, poster prezentacija
- Lipanj 2024. - Croatian Summer School of Endocrinology
- Rujan 2022. - 10th Croatian Congress of Pharmacology and the 1st Croatian Congress of Clinical Pharmacology with International Participation
- Lipanj 2022. - Tečaj trajnog medicinskog usavršavanja "Dijabetes - od teorije do prakse", usmeno izlaganje
- Listopad 2021. - Položen tečaj naprednih mjera održavanja života u organizaciji Hrvatskog društva za reanimatologiju Hrvatskog liječničkog zbora
- Veljača 2020. - Poslijediplomski tečaj trajne medicinske izobrazbe I. kategorije "Kardiometabolički poremećaji – od teorije do prakse", usmeno izlaganje

PUBLIKACIJE

1. Mornar M, Bozic J, Pavlovic N, Vrdoljak J, Kumric M, Vilovic T, Kurir TT, **Grahovac M**, Vilovic M. Associations of Handgrip Strength with Bone Health and Mental Health in Postmenopausal Women: A Cross-Sectional Study. *Medicina (Kaunas)*. 2025. 28;62(1):55. doi: 10.3390/medicina62010055.
2. **Grahovac M**, Kumric M, Vilovic M, Supe-Domic D, Pavlovic N, Bukic J, Ticinovic Kurir T, Bozic J. Endocannabinoid and AGE Interactions in Prediabetes: The Role of Mediterranean Diet Adherence. *Nutrients*. 2025. 17(15):2517. doi: 10.3390/nu17152517.
3. Komic L, Kumric M, Komic J, Tomicic M, Kurir TT, **Grahovac M**, Mornar M, Rusic D, Bukic J, Bozic J. The Hidden Price of Plenty: Oxidative Stress and Calorie-Induced Cardiometabolic Dysfunction. *Life (Basel)*. 2025. 27;15(7):1022. doi: 10.3390/life15071022.
4. Krešo A, **Grahovac M**, Znaor L, Marušić A. Safety reporting in trials on glaucoma interventions registered in ClinicalTrials.gov and corresponding publications. *Sci Rep*. 2024. 12;14(1):27762. doi: 10.1038/s41598-024-79394-z.
5. Rusic D, Kumric M, Seselja Perisin A, Leskur D, Bukic J, Modun D, Vilovic M, Vrdoljak J, Martinovic D, **Grahovac M**, Bozic J. Tackling the Antimicrobial Resistance "Pandemic" with Machine Learning Tools: A Summary of Available Evidence. *Microorganisms*. 2024. 23;12(5):842. doi: 10.3390/microorganisms12050842.
6. Vucinovic A, Bukic J, Rusic D, Leskur D, Seselja Perisin A, Radic M, **Grahovac M**, Modun D. Evaluation of Reporting Quality of Glaucoma Randomized Controlled Trial Abstracts: Current Status and Future Perspectives. *Life (Basel)*. 2024. 12;14(1):117. doi: 10.3390/life14010117.
7. Komic L, Kumric M, Urlic H, Rizikalo A, **Grahovac M**, Kelam J, Tomicic M, Rusic D, Ticinovic Kurir T, Bozic J. Obesity and Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential: Allies in Cardiovascular Diseases and Malignancies. *Life (Basel)*. 2023. 10;13(6):1365. doi: 10.3390/life13061365.
8. Vrdoljak J, Kreso A, Kumric M, Martinovic D, Cvitkovic I, **Grahovac M**, Vickov J, Bukic J, Bozic J. The Role of AI in Breast Cancer Lymph Node Classification: A Comprehensive Review. *Cancers (Basel)*. 2023. 21;15(8):2400. doi: 10.3390/cancers15082400.

9. **Grahovac M**, Kumric M, Vilovic M, Martinovic D, Kreso A, Ticinovic Kurir T, Vrdoljak J, Prizmic K, Bozic J. Adherence to Mediterranean diet and advanced glycation endproducts in patients with diabetes. *World J Diabetes*. 2021. 15;12(11):1942-56. doi: 10.4239/wjd.v12.i11.1942.

KONGRESNI SAŽETCI

1. **Grahovac M**, Mizdrak M, Mornar M, Krnić M, Tičinović Kurir T. Severe hypokalemia and hypertensive crisis as initial manifestation of adrenocortical carcinoma: a case report. Croatian Summer School Of Endocrinology, Vodice, rujan 2025. (usmeno izlaganje)
2. Mornar M, **Grahovac M**, Bilalic A, Kumric M, Ticinovic Kurir T, Krnic M, Bozic Josko. Hypoparathyroidism as a cause of recurrent ventricular tachycardias. 12. Hrvatski endokrinološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Šibenik, ožujak 2025. (poster prezentacija)
3. Mornar M, **Grahovac M**, Marinović Ljubković J, Boban M, Ljubković M. The impact of 1-week empagliflozin treatment on cardiac mitochondrial respiration and ROS production in healthy rats. 9th European Congress of Pharmacology (EPHAR), Atena, svibanj 2024. (poster prezentacija)
4. **Grahovac M**, Mornar M, Matijević J, Boban M, Ljubković M, Marinović-Ljubković J. In vivo and in vitro empagliflozin pretreatment does not protect isolated rat cardiomyocytes for oxidative stress-induced damage. 9th European Congress of Pharmacology (EPHAR), Atena, svibanj 2024. (poster prezentacija)
5. Mornar M, Filipović N, **Grahovac M**, Gujinović D, Dželalija AM, Grković I, Boban M, Mudnić I. Is vascular responsiveness of the isolated rat aorta affected by 4 weeks of moderate standard and macerated white wine consumption? 10th Croatian Congress of Pharmacology and the 1st Croatian Congress of Clinical Pharmacology with International Participation, Opatija, rujan 2022. (poster prezentacija)
6. Benzon B, Mastelić A, **Grahovac M**, Matijević J, Marinović Ljubković J, Ljubković M, Mudnić I, Grković I, Boban M. Effect of moderate white wine consumption on the expression of hsp70, gpx, cat and nqo1 in rat cardiomyocytes. 10th Croatian Congress of Pharmacology and the 1st Croatian Congress of Clinical Pharmacology with International Participation, Opatija, rujan 2022. (usmeno izlaganje)