



UNIWERSYTET RZESZOWSKI
COLLEGIUM MEDICUM
WYDZIAŁ MEDYCZNY

Lek. Katarzyna Jakubek-Kipa

**Rola leptyny i chemeryny
w patogenezie otyłości i cukrzycy typu 1 u dzieci**

The role of leptin and chemerin
in pathogenesis of obesity and type 1 diabetes in children

Rozprawa na stopień doktora w oparciu o cykl publikacji naukowych
w dziedzinie nauki medyczne i nauki o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

pod kierunkiem promotora

Prof. dr hab. n. med. Artura Mazura

oraz promotor pomocniczej

Dr hab. n. med. Sabiny Galiniak

Rzeszów 2025 r.

**Składam serdeczne podziękowania
dla Pana Prof. dr hab. n. med. Artura Mazura oraz Pani Dr hab. n. med. Sabiny Galiniak
za nieocenione wsparcie, inspirację oraz cenne wskazówki, które pozwoliły mi zrealizować
niniejszą rozprawę doktorską. Państwa wiedza i zaangażowanie były dla mnie ogromnym
wsparciem na każdym etapie pracy.**

SPIS TREŚCI

Rozdział I.	Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej.	4
Rozdział II.	Wykaz skrótów użytych w pracy.	5
Rozdział III.	Wstęp.	6
Rozdział IV.	Cel pracy doktorskiej.	12
Rozdział V.	Materiały i metody.	13
Rozdział VI.	Treść publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.	16
Rozdział VII.	Wyniki.	37
Rozdział VIII.	Dyskusja.	39
Rozdział IX.	Wnioski.	47
Rozdział X.	Literatura.	48
Rozdział XI.	Streszczenie w języku polskim.	55
Rozdział XII.	Streszczenie w języku angielskim.	56
Rozdział XIII.	Wykaz pozostałego dorobku naukowego.	57
Rozdział XIV.	Oświadczenia współautorów publikacji.	59
Rozdział XV.	Zgody komisji bioetycznej.	69

Rozdział I. – Wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej:

1. Bioleptin as a useful marker of metabolic status in children with diabetes mellitus type 1. Jakubek-Kipa K, Galiniak S, Łagowska K, Krupa I, Ludwin A, Tabarkiewicz J, Mazur A. *Frontiers in Endocrinology*. 2023;14:1235409. doi: 10.3389/fendo.2023.1235409.

IF=3,9; MEiN=100

2. Methylation status of leptin receptor gene promoter in obese children. Jakubek-Kipa K, Potocka P, Skrzypa M, Dembiński Ł, Zawlik I, Mazur A. *Pediatrics Polska*. 2020;95(2):86-91. doi: 10.5114/polp.2020.97117.

MEiN=100

3. Role of chemerin in the metabolic regulation of type I diabetes in children. Jakubek-Kipa K, Galiniak S, Mazur A. *Pediatrics i Medycyna Rodzinna*. 2024;20(2):209-214. doi: 10.15557/PiMR.2024.0030.

IF=3,6; MEiN=20 (w dniu przyjęcia do publikacji)

Rozdział II. - Wykaz skrótów użytych w pracy.

AMPK (ang. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) kinaza białkowa aktywowana monofosforanem adenozyiny

BMI (ang. *body mass index*) wskaźnik masy ciała

CMKLR1 (ang. *chemokine like receptor 1*) receptor chemokinopodobny typu 1

COBRA (ang. *combined bisulfite restriction analysis*) metoda bisulfidowa połączona z analizą restrykcyjną

CpG (ang. *cytosine-phosphate-guanine*) cytozyna-fosforan-guanina

DM1 (ang. *diabetes mellitus type 1*) cukrzyca typu 1

DNA (ang. *deoxyribonucleic acid*) kwas deoksyrybonukleinowy

ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinase*) kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym

FSH folikulotropina, hormon folikulotropowy

FTO (ang. *fat mass and obesity-associated gene*) gen związany z masą tłuszczową i otyłością

GnRh gonadoliberyna

HbA1c hemoglobina glikowana

HDL (ang. *high-density lipoprotein*) cholesterol frakcji lipoprotein o dużej gęstości

IL interleukina

IRS (ang. *insulin receptor substrate*) substrat receptora insuliny

ISPAD (ang. *International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes*) Międzynarodowe Towarzystwo Diabetologii Dzieci i Młodzieży

JAK2 (ang. *Janus kinase*) kinaza Janusowa

LDL (ang. *low-density lipoprotein*) cholesterol frakcji lipoprotein o małej gęstości

LEPR (ang. *leptin receptor*) receptor leptyny

LH lutropina, hormon lutenizujący

MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinase*) kinaza białkowa aktywowana mitogenem

PI3K (ang. *phosphatidylinositol 3-kinase*) kinaza fosfatydyloinozytolu 3

RNA (ang. *ribonucleic acid*) kwas rybonukleinowy

STAT3 (ang. *signal transducer and activator of transcription*) przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji

TNF α (ang. *tumor necrosis factor α*), czynnik martwicy nowotworów α

WHO (ang. *World Health Organization*) Światowa Organizacja Zdrowia

Rozdział III. - Wstęp.

W ciągu ostatnich lat obserwujemy niepokojący wzrost liczby dzieci cierpiących zarówno z powodu otyłości, jak i cukrzycy typu 1 (ang. *diabetes mellitus type 1*, DM1). Wydaje się to paradoksem, ponieważ DM1 była tradycyjnie kojarzona z niską masą ciała. Jednak zmieniający się styl życia, nawyki żywieniowe i brak aktywności fizycznej doprowadziły do sytuacji, w której coraz więcej dzieci z DM1 zmagają się również z nadmierną masą ciała. Otyłość wśród dzieci z cukrzycą typu 1 staje się coraz bardziej powszechnym problemem, podobnie jak w ogólnej populacji dziecięcej. Badania wykazują, że dzieci i młodzież z DM1 są narażone na podobne ryzyko nadwagi i otyłości, jak ich zdrowi rówieśnicy. Systematyczny przegląd badań przeprowadzony przez Grabię i wsp. wykazał, że średnio 20,1% dzieci z DM1 ma nadwagę, a 9,5% cierpi na otyłość (1). Tkanka tłuszczowa postrzegana jako główny magazyn energii, odgrywa również kluczową rolę w homeostazie metabolicznej organizmu. Badania nad tkanką tłuszczową odkryły jej istotne funkcje endokrynne, co zrewolucjonizowało zrozumienie jej roli w regulacji równowagi energetycznej, a także w regulacji metabolizmu glukozy. Tkanka tłuszczowa wydziela różne hormony, zwane adipokinami, które wpływają na procesy metaboliczne, w tym na regulację poziomu glukozy we krwi (2).

Leptyna odkryta w 1994 roku jest kluczowym regulatorem homeostazy energetycznej, wpływającym na apetyt i wydatkowanie energii. Jest białkiem zaliczanym do rodziny adipokin i obecnie uznawana jest za hormon składający się ze 167 aminokwasów o masie cząsteczkowej 16 kDa. Wykazuje działanie autokrynne, parakrynne i endokrynne (3). Jej wydzielanie przebiega według rytmu dobowego, osiągając maksimum w nocy. Kobiety zwykle mają wyższy poziom leptyny niż mężczyźni o tej samej masie ciała, co tłumaczy się wyższym u mężczyzn procentem beztłuszczowej masy ciała (4). Leptyna działa poprzez swoiste receptory transbłonowe wykazujące podobieństwo do receptorów cytokin klasy 1. Receptory te są szeroko rozpowszechnione w narządach docelowych takich jak mózg, serce, płuca, nerki, wątroba, trzustka, jelito czy łożysko. Receptor leptyny występuje w postaci kilku izoform: długiej OB-Rb, zdolnej do przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego, krótkich OB-Ra, OB-Rc, OB-Rd oraz izoformy rozpuszczalnej OB-Re, która wpływa na biodostępność leptyny w tkankach, hamując wiązanie z receptorami błonowymi i wykazując korelacje przeciwstawne do działania leptyny. Sygnalizacja leptyny po połączeniu jej cząsteczki z receptorem opiera się na autofosforylacji receptora, aktywując szlaki JAK2-STAT3, IRS/PI3K, MAPK-ERK i AMPK (5). Leptyna przenika przez barierę krew-mózg łączy się z receptorami zlokalizowanymi w jądrach podwzgórza. Miejscem jej działania jest między innymi jądro łukowate. Leptyna hamuje szlak oreksygeny zmniejszając ekspresję genów kodujących najsilniejszych stymulatorów apetytu takich jak neuropeptyd Y, białko Agouti, galanina, oreksyna i stymuluje szlak anoreksogeny zwiększając wydzielanie peptydów pobudzających uczucie sytości tj. hormonu α -

melanotropowego i białka CART (ang. *cocaine- and amphetamine regulated transcript*), co określa jej kluczową rolę w regulacji masy ciała. Wykazano również, że leptyna hamuje wydzielanie greliny jednego z najważniejszych czynników pobudzających apetyt (6). Wiele dowodów wskazuje na jej udział w licznych procesach zachodzących w organizmie takich jak dojrzewanie, homeostaza glukozy, neurogeneza, neuroprotekcja, hematopoeza, regulacja układu odpornościowego, angiogeneza, regulacja ciśnienia tętniczego krwi, filtracja kłębuszkowa, przebudowa kości i wielu innych (7). Produkcja i wydzielanie leptyny jest regulowana przez różne czynniki w tym insulinę, glikokortykoidy, cytokiny oraz noradrenalinę (8). Chociaż obecność receptorów leptyny została początkowo zidentyfikowana w neuronach podwzgórza, są one również obecne w komórkach kory mózgowej i hipokampa, czyli obszarach odpowiedzialnych za procesy myślenia i zapamiętywania. Leptyna jest aktywatorem transkrypcji białek niezbędnych do tworzenia synaps (9). Wykazano neuroprotekcyjne działanie leptyny, a także jej rolę w regulacji procesów neurozapalnych w chorobie Parkinsona oraz dysfunkcji mitochondriów w chorobie Alzheimer (10,11). Istnieją dane wykazujące związek między stężeniem leptyny a depresją (12). Ponadto omawiana cytokina wykazuje działanie w procesie dojrzewania płciowego i rozmnażania, stymulując wydzielanie gonadoliberyny z podwzgórza oraz hormonów gonadotropowych z przedniego płata przysadki mózgowej: hormonu lutenizującego (LH) i hormonu folikulotropowego (FSH). Proces ten odbywa się zarówno przez bezpośredni jej wpływ na neurony GnRH (hormon uwalniający gonadotropiny), jak i za pośrednictwem układu kisspeptyn (produktów genu *KISS1*), który kontroluje aktywność neuronalną GnRH. Badania wykazały, że zarówno niedobór produktów genu *KISS1*, jak i leptyny skutkuje hipogonadyzmem hipogonadotropowym (13). Odpowiednie stężenie leptyny we krwi jest sygnałem dla organizmu o jego gotowości do zapłodnienia i utrzymania ciąży, a także umożliwia skok pokwitaniowy, zapoczątkowanie i utrzymanie cyklu miesięczkowego (14,15). Rola leptyny w procesach zachodzących w układzie odpornościowym jest złożona i nie do końca poznana. Omawiana cząsteczka wpływa na odporność wrodzoną poprzez stymulację fagocytozy, syntezy tlenu azotu i produkcji cytokin prozapalnych w makrofagach. W neutrofilach pobudza chemotaksję i uwalnianie reaktywnych form tlenu (16). Pobudza również aktywację limfocytów T, rekrutację neutrofilów, komórek NK oraz makrofagów. Stymuluje syntezę i wydzielanie cytokin prozapalnych, m.in.: czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α), interleukin (IL)-2, IL-8 i IL-18, prostaglandyny E2 czy białka chemotaktyczne dla monocytów. Wykazuje także działanie prozapalne poprzez zwiększenie wydzielania cytokin, takich jak IL-6 czy IL-12 (17). W badaniach zaobserwowano wpływ hiperleptynemii na ciężkość choroby niedokrwiennej serca oraz występowanie zdarzeń sercowo-naczyniowych. Podwyższony poziom leptyny obserwowano u pacjentów z kardiomiopatią rozstrzeniową i przerostem lewej komory serca. Wykazano również jej związek z zastoinową niewydolnością krążenia, a także wysokimi wartościami ciśnienia tętniczego krwi u otyłych pacjentów. Z drugiej zaś strony w badaniach na otyłych gryzoniach z cukrzycą obserwowano

korzystny wpływ leptyny na metabolizm mięśnia sercowego poprzez wspomaganie procesów przemian glukozy oraz utleniania kwasów tłuszczowych (18). Wiele doniesień wskazuje na pronowotworowe działanie leptyny. Wykazano jej związek z promowaniem proliferacji komórek raka endometrium oraz migracji komórek raka piersi, nowotworami związanymi z otyłością takimi jak rak jelita grubego, rak szyjki macicy, jajnika, dodatkowo z rozwojem glejaka czy raka płuc. W licznych badaniach naukowych udowodniono, że leptyna i jej receptor ulegają nadmiernej ekspresji w wyżej wymienionych nowotworach. Omawiana cytokina poprzez aktywację sygnalizacji JAK2/STAT3, PI3K i ERK moduluje ekspresję genów, takich czynników jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego, cykliny D1 i cyklooksygenaza-2, co sprzyja angiogenezie, proliferacji i migracji komórek, jak również może hamować apoptozę. Dodatkowo przez swój wpływ na syntezę czynników prozapalnych prowadzi do zwiększenia inwazji komórek nowotworowych. Wykazano, że leptyna przez aktywację szlaku sygnałowego MAPK może wpływać na przejście nabłonkowo-mezenchymalne, czyli zdolność komórek nabłonkowych do zmiany morfologii, co przyspiesza rozwój przerzutów nowotworowych. Badania nad rolą leptyny w rozwoju nowotworów nie są jednak jednoznaczne, w części doniesień wykazano hamujący wpływ leptyny na rozwój raka trzustki czy raka wątroby (19,20).

Oddziaływanie leptyny na metabolizm glukozy odbywa się poprzez stymulację sygnalizacji insuliny, zwiększenie wrażliwość tkanek obwodowych na insulinę, co ułatwia wychwyt glukozy przez komórki, regulację pracy wątroby przez wpływ na glukoneogenezę i glikogenolizę, co z kolei pomaga w utrzymaniu stabilnego poziomu glukozy we krwi (21). Insulina odpowiada za utrzymanie prawidłowego magazynowania i wykorzystania energii, natomiast leptyna zmniejsza bieżący pobór energii. Dlatego oba te hormony są niezbędne do centralnej regulacji wydatku energetycznego i homeostazy glukozy (22). Dodatkowo przyjmuje się, że ośrodkowe działanie leptyny, które niweluje hiperglikemię, odbywa się poprzez hamowanie odpowiedzi kontregulacyjnej (16). Ostatnio wykazano, że wpływ leptyny na wydzielanie insuliny jest antagonizowany przez TNF- α poprzez zmniejszenie ekspresji ObRb, co wywołuje oporność na działanie leptyny i zmiany w homeostazie glukozy (23). Podwyższony poziom leptyny wiąże się również z insulinoopornością i cukrzycą typu 2 (24). Najwięcej badań naukowych potwierdza niepodważalną rolę leptyny w regulacji masy ciała. Brak leptyny lub jej receptorów wynikający z mutacji genów prowadzi do niepohamowanego głodu (25). Znane jest również zjawisko leptynooporności, gdzie pomimo obecności prawidłowej cząsteczki leptyny występuje upośledzenie jej działania, które może wynikać ze zmniejszonej ekspresji receptorów, ze zmiany szlaków sygnałowych lub zakłóceń w jej transporcie przez barierę krew-mózg (26). Mutacje w genie leptyny prowadzące do braku produkcji leptyny są jedną z rzadkich przyczyn otyłości monogenowej. Na fenotyp kliniczny pacjentów z wrodzonym niedoborem leptyny wywołanymi mutacjami w genie leptyny składają się: prawidłowa urodzeniowa masa ciała, szybki przyrost masy ciała po urodzeniu, otyłość olbrzymia we wczesnym dzieciństwie, upośledzenie

uczucia sytości i intensywna hiperfagia, ciągle poszukiwanie pożywienia, nawracające ciężkie i często letalne infekcje bakteryjne, rozwój hiperinsulinemii u części pacjentów we wczesnym dzieciństwie, ciężkie stłuszczenie wątroby, rozwój dyslipidemii oraz hipogonadyzm hipogonadotropowy. Podobnie jak w przypadku mutacji genu leptyny, mutacje w genie kodującym jej receptor prowadzą do zaburzeń w przekazywaniu sygnałów leptynowych do podwzgórza. Osoby z mutacjami w genie receptora leptyny mają zredukowaną lub całkowicie zniesioną odpowiedź na leptynę, mimo jej prawidłowych lub podwyższonych poziomów we krwi. Mutacje te mogą prowadzić do otyłości olbrzymiej o wczesnym początku, hiperfagii oraz oporności na insulinę (27). Do rozwoju otyłości prowadzą także mutacje genów kodujących inne białka szlaku leptyna-melanokortyna, takich jak proopionelanokortyna, konwertaza prohormonu 1, receptor melanokortyny 4 (MC4R), czynnik neurotroficznego pochodzenia mózgowego (27,28). Mutacje genu *MC4R* uważane są obecnie za najczęstszą przyczynę otyłości monogenowej u dzieci (29). Wabitsch i wsp. wykazali, że leptyna może być obecna w surowicy krwi w wysokich stężeniach, ale może być nieaktywna biologicznie. Brak aktywności biologicznej polega na zaburzeniu wiązania się leptyny z jej receptorem, co wynika ze zmienionej struktury jej cząsteczki. Udowodniono, że u podłoża tego zaburzenia leży mutacja p.N103K, której skutkiem jest wymiana argininy na lizynę oraz p.D100Y powodująca zamianę kwasu asparaginowego na tyrozynę (25,28). Leptyna aktywna biologicznie – bioleptyna wykazuje zdolność do połączenia ze swoistym receptorem i tym samym ma możliwość przekazania sygnału wewnątrzkomórkowego (25). W świetle tego odkrycia oraz niekwestionowanej roli leptyny w regulacji gospodarki węglowodanowej wydaje się uzasadniona ocena poziomu bioleptyny u pacjentów z cukrzycą. U osób z DM1 stężenie leptyny może być obniżone ze względu na niską zawartość tkanki tłuszczowej oraz niedobór insuliny obecny przed włączeniem leczenia. Ciekawe wydaje się zatem poszukiwanie odpowiedzi na pytanie, czy u pacjentów z DM1, przy niedoborze leptyny, może dochodzić do zwiększenia ekspresji jej receptora w celu poprawy biodostępności. W modelach zwierzęcych wykazano, że podanie leptyny może poprawiać kontrolę glikemii i obniżać zapotrzebowanie na insulinę, co sugeruje, że leptyna może mieć potencjalne znaczenie terapeutyczne w DM1 (29). Może ona także odgrywać kluczową rolę w regulacji metabolizmu lipidów u pacjentów z DM1, a jej suplementacja mogłaby pomóc w zapobieganiu dyslipidemii, co jest częstym powikłaniem w tej grupie chorych. Badania nad rolą leptyny w procesach autoimmunologicznych mogą dostarczyć nowych informacji na temat mechanizmów wpływających na destrukcję komórek β trzustki. Ponieważ omawiana cząsteczka wpływa na aktywność limfocytów T może mieć znaczenie w odpowiedzi immunologicznej w DM1 (30). Leptyna wykazuje duży potencjał jako dodatek do terapii insulinowej w leczeniu DM1. Jej zdolność do poprawy metabolizmu glukozy, zmniejszenia zapotrzebowania na insulinę i regulacji masy ciała może przynieść znaczne korzyści pacjentom. Jednak konieczne są dalsze badania, aby w pełni zrozumieć jej rolę i zapewnić bezpieczne i skuteczne stosowanie w praktyce klinicznej (31).

Liczne badania naukowe przyniosły odkrycie mechanizmów epigenetycznych, które odgrywają kluczową rolę w adaptacji fenotypu pod wpływem czynników środowiskowych bez zmiany kodu genetycznego. Epigenetyka to dziedzina badająca dziedziczne zmiany w ekspresji genów, które nie wynikają z modyfikacji sekwencji kwas deoksyrybonukleinowy (DNA), lecz są regulowane przez różne mechanizmy, takie jak metylacja DNA, modyfikacje histonów i działanie mikroRNA (kwas rybonukleinowy). Metylacja DNA polega na przyłączeniu grupy metylowej z donora – najczęściej S-adenozylometioniny na atom węgla w pozycji 5 pierścienia pirymidynowego cytozyny w kontekście dinukleotydu cytozyna-guanina (ang. *cytosine-phosphate-guanine*, CpG) (5'-CpG-3') w reakcji katalizowanej przez metylotransferazy DNA. Wyspy charakteryzujące się zwiększoną zawartością dinukleotydu CpG w największej liczbie występują w rejonach promotorowych genów. Zwiększona metylacja promotorów genów może prowadzić do ich wyciszenia, podczas gdy hipometylacja sprzyja ich aktywacji. Zmiany epigenetyczne mogą być wywoływane przez czynniki środowiskowe, takie jak dieta, aktywność fizyczna, stres czy zanieczyszczenia środowiska. S-adenozylometionina powstaje w wyniku bezpośredniej aktywacji metioniny dostarczanej z pożywienia lub w wyniku przemian homocysteiny z udziałem folianów (32). Wzrost częstości występowania otyłości obserwowany na całym świecie zmusza do głębszego zrozumienia mechanizmów jej rozwoju. Czynniki środowiskowe są kluczowymi determinantami otyłości, a rosnące dowody wskazują na istotną rolę procesów epigenetycznych w modulowaniu podatności na otyłość (33). W badaniach na zwierzętach wykazano, że stosowanie diety wysokoenergetycznej prowadzi do zwiększenia metylacji wysp CpG w zakresie genu promotora leptyny, co z kolei doprowadza do hipoleptynemii (34). Co więcej wykazano, że metylacja promotora leptyny oceniona po urodzeniu i w 12. miesiącu życia jest predyktorem wagi i otyłości w dzieciństwie (35). Większość opracowań naukowych skupia swoją uwagę na zjawiskach epigenetycznych w kontekście genu leptyny. W obecnej rozprawie doktorskiej badano to zjawisko w odniesieniu do genu receptora leptyny.

Chemeryna została odkryta w 1997 roku, pierwotnie zidentyfikowana w zmianach łuszczykowych, wraz z obserwacją, iż jej ekspresja wzrasta po miejscowym zastosowaniu retinoidu tazarotenu, stąd jej początkowa nazwa tazarotene-induced gene 2 (36). W 2003 roku odkryto sekwencję białka chemeryny, od tego momentu otrzymało ono obecną nazwę (37). Jej największe stężenie obserwowane jest w wątrobie, tkance tłuszczowej oraz w łożysku, mniejsze w trzustce, mięśniach szkieletowych i sercu. Wydzielana zostaje jako nieaktywna prochemeryna, białko składające się ze 163 aminokwasów, a następnie ulega aktywacji poprzez proteolizę. Swoje działanie wywiera przez połączenie z receptorem chemokinopodobnym typu 1, znanym również jako receptor chemeryny 23, obecnie nazywany Chem 1. Wykazuje również powinowactwo do receptora sprzężonego z białkiem G typu 1 oraz receptora chemokinopodobnego typu 2 (38,39). Chemeryna jest ważną adipokina, która wpływa na metabolizm glukozy poprzez różnorodne mechanizmy, w tym regulację wrażliwości na

insulinę, modulację glukoneogenezy w wątrobie oraz wpływ na adipogenezę. Wysoki poziom chemeryny jest często obserwowany u osób otyłych, a jej podwyższone stężenie koreluje z insulinopornością, cukrzycą typu 2 oraz zespołem metabolicznym. Badania wskazują, że chemeryna może także wpływać na metabolizm lipidów. Częsteczka ta stymuluje wychwyt glukozy zależny od insuliny w adipocytach i promuje różnicowanie zarówno białej, jak i brązowej tkanki tłuszczowej (40). Ogrywa również rolę w regulacji angiogenezy (41). W badaniach na modelach zwierzęcych wykazano, że nadekspresja chemeryny prowadzi do zmniejszenia wrażliwości na insulinę oraz pogorszenia tolerancji glukozy, co może przyczyniać się do rozwoju insulinoporności. Mechanizmy te są związane z oddziaływaniem chemeryny na receptor Chem1, który jest wyrażany na adipocytach i komórkach mięśni szkieletowych (42). Chemeryna pełni kluczową rolę w inicjacji i rozwoju stanów zapalnych. Jest silnym czynnikiem, przyciągającym komórki układu odpornościowego do miejsc zapalenia, co może wspierać zarówno reakcje obronne organizmu, jak i patologiczne stany zapalne. Ponadto niektóre formy chemeryny wykazują właściwości antybakteryjne, co podkreśla jej złożoną rolę w odpowiedzi immunologicznej. Coraz więcej dowodów wskazuje, że chemeryna może odgrywać rolę w procesach nowotworowych. Jej wpływ na mikrośrodowisko guza, zwłaszcza na rekrutację komórek odpornościowych, może mieć dwojaki efekt: z jednej strony może promować odpowiedź przeciwnowotworową, z drugiej zaś sprzyjać rozwojowi nowotworu poprzez wspieranie angiogenezy i tłumienie odpowiedzi immunologicznej (43). Dysfunkcja chemeryny, obserwowana w stanach takich jak otyłość i cukrzyca typu 2, podkreśla jej znaczenie w homeostazie glukozy i sugeruje potencjalne cele terapeutyczne w celu poprawy metabolizmu (43). Stąd wydaje się zasadne zbadanie jej roli w DM1. Modulacja poziomu chemeryny i jej szlaków sygnalizacyjnych może stanowić nowy kierunek w terapii zaburzeń metabolicznych. Inhibitory receptorów chemeryny lub jej antagoniści mogą być potencjalnymi lekami poprawiającymi wrażliwość na insulinę i regulującymi poziom glukozy.

W obliczu narastającego problemu otyłości wśród dzieci z DM1 rola hormonów wydzielanych przez tkankę tłuszczową, takich jak leptyna i chemeryna, stała się przedmiotem intensywnych badań. Niniejsza rozprawa doktorska koncentruje się na ocenie poziomu tych adipokin u dzieci z DM1, co może przyczynić się do lepszego zrozumienia ich potencjalnego wpływu na patofizjologię DM1. Zrozumienie tych zagadnień jest kluczowe dla zapewnienia dzieciom zdrowego startu w dorosłe życie oraz minimalizacji ryzyka powikłań zdrowotnych w przyszłości.

Rozdział IV. - Cel pracy doktorskiej.

Wspólnym celem cyklu trzech publikacji była analiza roli leptyny i chemeryny w patogenezie otyłości i cukrzycy typu 1 u dzieci.

Realizacja celu głównego nastąpiła poprzez cele szczegółowe:

1. Celem szczegółowym publikacji 1 była ocena stężenia leptyny i bioleptyny w surowicy krwi dzieci z DM1 oraz określenie korelacji między ich poziomem a wybranymi parametrami kontroli cukrzycy, takimi jak: ciężkość kwasicy ketonowej przy rozpoznaniu choroby, poziom hemoglobiny glikowanej (HbA1c), profil lipidowy oraz wskaźnik masy ciała (ang. *body mass index*, BMI).
2. Celem szczegółowym publikacji 2 była ocena statusu metylacji promotora genu receptora leptyny u dzieci z otyłością.
3. Celem szczegółowym publikacji 3 była ocena stężenia chemeryny w surowicy krwi dzieci z DM1 oraz określenie korelacji jej poziomu z wybranymi parametrami kontroli cukrzycy, takimi jak: poziom HbA1c, profil lipidowy oraz BMI.

Rozdział V. - Materiały i metody.

Na przeprowadzanie badań uzyskano zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Rzeszowskiego (nr 2018/03/08 oraz nr 22/04/2016).

Dotyczy publikacji 1 i 3

Charakterystyka grupy badanej

Rekrutacja do badania odbywała się w II Klinice Pediatrii Endokrynologii i Diabetologii Dziecięcej Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego nr 2 w Rzeszowie. Badaniem objęto 94 dzieci w wieku $11,53 \pm 4,37$ lat (58 chłopców i 36 dziewczynek z DM1 oraz 14 dzieci zdrowych). W grupie dzieci z cukrzycą 40 pacjentów miało nowo rozpoznaną cukrzycę, 40 długotrwałą DM1 (długotrwałą zdefiniowano jako trwającą dłużej niż rok). W grupie pacjentów z długotrwałą DM1, 20 dzieci miało dobrą kontrolę metaboliczną, co oznaczało poziom HbA1c $<7\%$, 20 złą – poziom HbA1c $>7\%$. Wszyscy rodzice byli rasy kaukaskiej, bez rodzinnej historii jakiegokolwiek typu cukrzycy. Grupa kontrolna składała się z 14 zdrowych dzieci w wieku $14,33 \pm 4,84$ lat (9 dziewczynek i 5 chłopców). Rozpoznanie DM1 oparto na kryteriach International Society of Pediatric and Adolescent Diabetes (ISPAD). Cukrzycę u dzieci leczono analogami insuliny w schemacie intensywnej insulinoterapii penowej lub za pomocą osobistej pompy insulinowej. Wartość BMI odnoszono do siatek centylowych według standardów WHO.

Ocena stężenia adipokin

U pacjentów z nowo rozpoznaną cukrzycą krew do badań pobierano w piątej dobie hospitalizacji po ustabilizowaniu stanu ogólnego przy okazji kontroli innych parametrów biochemicznych. Żyłną krew obwodową pobierano do probówki z aktywatorem krzepnięcia (Sarstedt, Inc., Niemcy). Próbkę odwirowywano przez 10 minut przy 1000xg, w temperaturze 4°C w wirówce 5702 R (Eppendorf AG, Niemcy). Surowicę przenoszono do probówek o pojemności 0,2 mL (Greiner-bio-one, Austria) i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu oznaczenia. Ilościowe oznaczenie całkowitej leptyny wykonano przy użyciu testu immunoenzymatycznego (ELISA) typu sandwich (E077, Mediagnost, Niemcy). Poziom bioleptyny był również oznaczany ilościowo za pomocą testu ELISA (L07, Mediagnost, Niemcy), jednak analit był wychwytywany przez rekombinowany receptor leptyny (SOB-R) unieruchomiony na płytce do mikromiareczkowania. Cała procedura została przygotowana zgodnie z protokołem producenta. Zgodnie ze specyfikacją producenta, współczynniki zmienności międzytestowej i wewnątrztestowej wynoszą poniżej 10% dla obu testów ELISA. Stężenie leptyny i bioleptyny podano w ng/mL. Obliczono stosunek biologicznie aktywnej leptyny do leptyny (bioLEP/LEP). Chemerynę oceniano za pomocą testu ELISA typu sandwich (E102, Mediagnost, Niemcy). Zgodnie ze specyfikacją producenta współczynniki zmienności między- i wewnątrztestowej wynoszą poniżej 10%. Stężenie chemeryny w surowicy wyrażono w ng/mL.

Pomiary absorbancji przeprowadzono na czytniku wielomodowym Tecan Infinite 200 PRO (Tecan Group Ltd.; Männedorf, Szwajcaria).

Analiza statystyczna

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu pakietu oprogramowania STATISTICA (wersja 13.3, StatSoft Inc. 2017, Tulsa, OK, USA). Dane zostały przedstawione jako średnia i odchylenie standardowe (SD) wraz z zakresem. Należy zauważyć, że większość zmiennych nie była zgodna z rozkładem normalnym, co potwierdził test Shapiro-Wilka, co wymagało zastosowania testów nieparametrycznych. Wielokrotne porównania przeprowadzono przy użyciu testu ANOVA Kruskala-Wallisa. Istotność statystyczną określono przy wartości $p < 0,05$.

Dotyczy publikacji 2

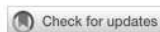
Charakterystyka grupy badanej

Do badania włączono 50 dzieci z nadwagą i otyłością (26 dziewcząt i 24 chłopców) hospitalizowanych w II Klinice Pediatrii Endokrynologii i Diabetologii Dziecięcej Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego nr 2 w Rzeszowie. Wszystkie dzieci zostały zważone i zmierzone w bieliźnie trzykrotnie i została wyznaczona średnia tych pomiarów. Pomiary przeprowadzono przy użyciu urządzenia RADWAG WPT 60/150. Obliczono BMI a dzieci sklasyfikowano na podstawie percentyli BMI dla płci i wieku według polskiego badania OLAF (44).

Ocena metylacji

Metylację promotora receptora leptyny (LEPR) analizowano przy użyciu metody połączonej analizy bisulfitu i restytucji (ang. *Combined Bisulphite Restriction Analysis*, COBRA). Metoda została zaprojektowana przy użyciu oprogramowania MethPrimer 2.0. Wyniki zostały sprawdzone przy użyciu narzędzia BiSearch Primer Design and Search Tool, aby uniknąć niespecyficznych produktów amplifikacji. Do analizy wykorzystano zestaw QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) w celu izolacji i oczyszczenia DNA z krwi pełnej. Pomiar stężenia i jakości wyizolowanego DNA przeprowadzono metodą spektrofotometryczną. Konwersję bisiarczynową przeprowadzono przy użyciu zestawu EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research). Przekonwertowane DNA (50 ng) przechowywano w temperaturze -20°C i amplifikowano przy użyciu TaKa Ra EpiTaq™ HS (dla DNA poddanego działaniu wodorosiarczynu) (Clontech) w następujący sposób: $1 \times$ bufor, 0,2 mM dNTPs, 1,75 mM MgCl_2 , 0,5 U polimerazy i 0,5 μM zaprojektowanych starterów w całkowitej objętości 20 μL . Optymalne warunki zostały określone jako: początkowa denaturacja w 94°C przez 15 minut, a następnie 35 cykli denaturacji w 94°C przez 45 s, annealing w 57°C przez 45 s, wydłużenie w 72°C przez 45 s, z końcowym wydłużeniem w 72°C przez 7 minut. Amplifikacje reakcja łańcuchowa polimerazy przeprowadzono w termocyklerze (T100™ Thermal Cycler) (Bio-Rad). Produkty

amplifikacji rozdzielono za pomocą elektroforezy w 2% żelu agarozowym (PB Genoplast Biochemicals) i wybarwiono barwnikiem Midori Green Stain (Nip pon Genetics). W przypadku promotora receptora leptyny zaobserwowano pojedyncze pasmo 330 bp. Następnie 5 i 7 μ L produktu reakcja łańcuchowa polimerazy wykorzystano do przeprowadzenia trawienia restrykcyjnego amplifikowanej sekwencji. Do analizy metylacji DNA wykorzystano DNA kontrolne EpiTect, całkowicie metylowane i całkowicie niemetylowane DNA przekształcone wodorosiarczynem. Do analizy restrykcyjnej wykorzystano dwa enzymy restrykcyjne: BstUI (ThermoFisher) i TaqI (ThermoFisher). Trawienie restrykcyjne przeprowadzono przy użyciu 10 U BstUI i 10 U TaqI w całkowitej objętości 16 μ L w temperaturze 65°C przez 18 h. Następnie reakcję zatrzymano przez inkubację w temperaturze 80°C przez 20 min. Produkty reakcji trawienia (15 μ L) poddano elektroforezie w 3% żelu agarozowym o wysokiej rozdzielczości (Blirt DNA) i wizualizowano za pomocą barwienia Midori Green. Dla regionów metylowanych zaobserwowano dwa pasma: 98 bp i 232 bp dla BstUI lub 96 bp i 234 bp dla TaqI.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Chunjie Jiang,
University of Pennsylvania, United States

REVIEWED BY
Dongjiao Zhao,
Messiah College, United States
Hui Wang,
University of Massachusetts Medical
School, United States
Chenchen Li,
University of Pennsylvania, United States

*CORRESPONDENCE
Katarzyna Jakubek-Kipa
✉ k_jakubek@op.pl

RECEIVED 06 June 2023
ACCEPTED 02 August 2023
PUBLISHED 21 August 2023

CITATION
Jakubek-Kipa K, Galiniak S, Łagowska K,
Krupa I, Ludwin A, Tabarkiewicz J and
Mazur A (2023) Bioleptin as a useful
marker of metabolic status in children
with diabetes mellitus type 1.
Front. Endocrinol. 14:1235409.
doi: 10.3389/fendo.2023.1235409

COPYRIGHT
© 2023 Jakubek-Kipa, Galiniak, Łagowska,
Krupa, Ludwin, Tabarkiewicz and Mazur. This
is an open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Bioleptin as a useful marker of metabolic status in children with diabetes mellitus type 1

Katarzyna Jakubek-Kipa^{1*}, Sabina Galiniak²,
Katarzyna Łagowska³, Izabela Krupa³, Aleksandra Ludwin³,
Jacek Tabarkiewicz^{3,4} and Artur Mazur¹

¹Department of Pediatrics, Institute of Medical Sciences, Medical College of Rzeszów University, Rzeszów, Poland, ²Department of Biochemistry and General Chemistry, Institute of Medical Sciences, Medical College of Rzeszów University, Rzeszów, Poland, ³Laboratory for Translational Research in Medicine, Centre for Innovative Research in Medical and Natural Sciences, Medical College of Rzeszów University, Rzeszów, Poland, ⁴Department of Human Immunology, Institute of Medical Sciences, Medical College of Rzeszów University, Rzeszów, Poland

Introduction: The purpose of our study was to measure the level of leptin and biologically active leptin (bioLEP) in children with type 1 diabetes, depending on the duration of diabetes and its degree of metabolic control.

Methods: The study included 94 children (58 boys and 36 girls). In a group of children with diabetes, 40 patients were newly diagnosed with type 1 diabetes, 40 children who have diabetes for more than a year (20 with good metabolic control and 20 with poor metabolic control). The control group consisted of 14 healthy children. The serum level of leptin and bioLEP was measured using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. To our knowledge, this is the first study to describe bioLEP levels among diabetic children with different forms of disease control.

Results: Lower levels of leptin were found in children with diabetes compared to healthy children. Furthermore, we found a statistically higher concentration of leptin in the group of children with newly diagnosed diabetes compared to children from the diabetic group with poor metabolic control and lower than healthy children (11.19 vs. 7.84 and 20.94 ng/mL). Moreover, children in the metabolically well-controlled group had statistically lower levels of this hormone (5.11 ng/mL) than healthy children. Leptin concentrations differed significantly between underweight, overweight, and obese children.

Discussion: In our study, the level of bioLEP differed significantly between children in the newly diagnosed diabetes group and children in the long-term, poorly controlled diabetes group and healthy controls. Despite many studies published in recent years, many aspects of leptin secretion, action, and mechanisms of its influence on carbohydrate and fat metabolism are still to be clarified. In our opinion, studies evaluating the status of bioLEP in diabetes can also contribute to a better understanding of the mechanisms regulating metabolism.

KEYWORDS

leptin, bioleptin, diabetes, children, BMI

1 Introduction

Type 1 and type 2 diabetes of youth is a major problem around the world. Reports suggest that among all cases of diabetes diagnosed in the US type 1 and type 2 diabetes account for approximately 6% and 91%, respectively (1, 2). Leptin, a 16 kDa protein hormone secreted into the circulation from white adipocytes, has been implicated in the regulation of food intake, body mass, and reproductive function and plays a role in fetal growth, pro-inflammatory immune responses, angiogenesis, and lipolysis (3, 4). Recent evidence suggests that the adiposity hormone leptin also plays an important role in controlling glucose metabolism through its actions in the brain (5). Circulating leptin is secreted into the bloodstream, reaches the brain through the blood-brain barrier, and acts on the hypothalamus (6). Both *in vivo* and *in vitro* studies suggest that insulin stimulates leptin synthesis (7). Serum leptin concentrations have been found to be higher in chronically insulin-treated diabetic children and adults with type 1 or 2 diabetes than in healthy controls and diabetics receiving other therapies (8). Furthermore, the leptin level has been reported to be lower before the start of insulin treatment in patients newly diagnosed with diabetes than in healthy controls (9, 10). According to recent reports, leptin may be present in high concentrations in some patients, but it is biologically inactive, so it cannot bind to its receptor (11, 12).

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the status of serum leptin and biologically active leptin (bioLEP - functional leptin) levels in children with three forms of diabetes (newly diagnosed, well and poorly controlled) and healthy controls.

2 Materials and methods

2.1 Study subjects

The study included 94 children at the age of 11.53 ± 4.37 (58 boys and 36 girls). In a group of children with diabetes, 40 patients had newly diagnosed type 1 diabetes, aged 9.47 ± 3.91 years, 40 with long-term type 1 diabetes aged 12.61 ± 3.76 (long term defined as lasting more than one year). In the group of patients with long-term type 1 diabetes, 20 children had good metabolic control (aged 11.86 ± 3.94) and 20 with poor metabolic control aged 13.37 ± 3.5 years. All the parents of the children were Caucasian with no family history of type 1 or any type of diabetes. The control group consisted of 14 healthy children aged 14.33 ± 4.84 years, 9 girls and 5 boys. The diagnosis of type 1 diabetes was based on the criteria of the International Society of Pediatric and Adolescent Diabetes (13). Participants were recruited from the Department of Pediatrics, Pediatric Endocrinology and Diabetology, and the Outpatient Endocrinology Clinic between January 2019 and April 2021. Leptin and bioLEP levels were determined on the fifth day of hospitalization after stabilization of the patient's general condition. The duration of diabetes treatment in the remaining patients was longer than 1 year. Patients with type 1 diabetes were treated with insulin analogues by intensive insulin therapy using pen or continuous subcutaneous insulin infusion with a personal insulin pump. Poor metabolic control of the disease was

defined as a level of glycated hemoglobin (HbA1c) above 7%. At the same time, 14 healthy children were included in the control group. Type 1 diabetes was excluded from the control group based on medical history, clinical examination, biochemical (c-peptide and HbA1c) and immunological tests. Children with a body mass index, defined as BMI > 85th percentile for sex and age, were also included in the study in both the diabetic and healthy children. BMI above the 85th percentile was not the reason for exclusion from the study groups. Next, we divided the patients according to BMI percentiles into three groups: 1) underweight - less than the third percentile, 2) healthy weight - third percentile to less than the 85th percentile, and 3) overweight and obesity - 85th and greater than the 85th percentile.

2.2 Biochemical analyses

Venous peripheral blood was drawn to a clotting activator tube (Sarstedt, Inc., Germany). Clotted samples were centrifuged for 10 minutes in 1000xg, at 4°C in a Centrifuge 5702 R (Eppendorf AG, Germany). Serum was transferred to 0.2 ml tubes (Greiner-bio-one, Austria) and cryopreserved at -80°C until the time of the experiment. Other clinical parameters were obtained from patient clinical records.

2.3 Leptin and bioLEP assay

Quantitative determination of total leptin was made using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (E077, Mediagnost, Germany). BioLEP was also quantified by ELISA (L07, Mediagnost, Germany), however the analyte was captured by recombinant produced leptin receptor (SOB-R) immobilized on a microtiter plate. The entire procedure was prepared according to the manufacturer's protocol. According to the manufacturer's specifications, the inter- and intra-assay coefficients of variation are below 10% for both ELISAs. Absorptiometric measurements were performed on a Tecan Infinite 200 PRO multimode reader (Tecan Group Ltd.; Männedorf, Switzerland). The quotients of biologically active leptin and leptin (bioLEP/LEP) were calculated.

2.4 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the STATISTICA software package (version 13.3, StatSoft Inc. 2017, Tulsa, OK, USA). Data were expressed as mean and SD, as well as range. Most variables did not follow a normal distribution, which was validated using the Shapiro-Wilk test, due to the nonparametric tests that were applied. Kruskal-Wallis ANOVA was used for multiple comparisons. A p-value below 0.05 was considered statistically significant.

2.5 Ethical approval

The study protocol was approved by the Bioethics Committee of the University of Rzeszow (Poland) 2018/03/08. All procedures performed in studies involving human participants were in

accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the Declaration of Helsinki of 1964 and its subsequent amendments or comparable ethical standards. Written informed consent was obtained from legal guardians and/or children.

3 Results

The characteristics of the study group are presented in Table 1. Children with newly diagnosed diabetes (NDM1) were statistically younger than children with long-term diabetes, metabolically poorly controlled (DM1n) ($p=0.007$) and healthy children ($p<0.001$). We did not find statistical differences between the mean age of girls and boys in the study group. Statistically, diabetes was treated longer in children in the DM1n group ($p<0.001$). Children with newly diagnosed diabetes had statistically lower body weight than children in the DM1n

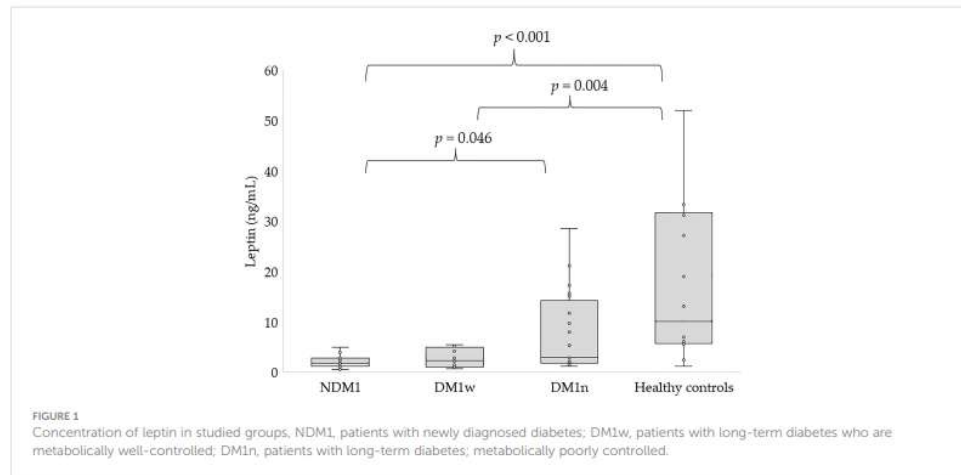
($p<0.001$) and control groups ($p=0.006$). Children with newly diagnosed diabetes had a statistically lower BMI than children in the DM1n group ($p<0.001$) and healthy children ($p=0.002$). Moreover, children in the NDM1 group had a statistically higher level of HbA1c compared to children with long-term diabetes, metabolically well controlled (DM1w) ($p<0.001$) group and healthy children ($p<0.001$). Children with long-term and well-controlled diabetes had statistically lower HbA1c levels than children in the DM1n group ($p<0.001$). There were no statistical differences in cholesterol and LDL levels. We observed a statistical difference in HDL level between children from the NDM1 group and DM1w ($p=0.036$). Finally, children in the NDM1 group had statistically higher triglyceride levels than children in the DM1w ($p<0.001$), DM1n ($p=0.002$) group and healthy children ($p=0.02$).

Figures 1, 2 present the level of leptin and bioLEP in the studied groups. We found a statistically higher concentration of leptin in the group of children with newly diagnosed diabetes compared to the children in the DM1n group (11.19 ± 52.16 vs 7.75 ± 7.94 ng/

TABLE 1 General characteristics of children included in the study*.

		NDM1	DM1		Healthy controls	p
			DM1w	DM1n		
Sex (F/M)		11/29	6/14	10/10	5/9	
Age (years)	mean $\pm$ SD	9.47 $\pm$ 3.91	11.86 $\pm$ 3.94	13.37 $\pm$ 3.5	14.33 $\pm$ 4.84	0.001
	range	2.2 - 16.1	2.9 - 17.9	5.1 - 17.8	3.6 - 17.6	
Duration of disease (months)	mean $\pm$ SD	-	27 $\pm$ 10.8	79 $\pm$ 31.9	-	<0.001
	range	-	11 - 49	27 - 152	-	
Weight (kg)	mean $\pm$ SD	34.64 $\pm$ 16.4	43 $\pm$ 16.38	55.44 $\pm$ 17.4	54.9 $\pm$ 18.7	0.001
	range	12 - 72	13.5 - 72	20.5 - 83	15 - 87	
BMI (kg/m ²)	mean $\pm$ SD	16.84 $\pm$ 3.67	18.05 $\pm$ 2.69	21.64 $\pm$ 3.54	21.22 $\pm$ 3.05	<0.001
	range	12.5 - 26.34	14.31 - 24.16	16.27 - 28.06	15.03 - 26.34	
BMI percentiles						
<3 rd	n (%)	7 (17.5)	0	0	0	
3 rd - 85 th	n (%)	27 (67.5)	16 (80)	13 (65)	11 (79)	
>85 th	n (%)	6 (15)	4 (20)	7 (35)	3 (21)	
HbA1c (%)	mean $\pm$ SD	11.78 $\pm$ 2.58	6.47 $\pm$ 0.48	10.18 $\pm$ 2.18	5.29 $\pm$ 0.19	<0.001
	range	6.93 - 17.03	5.23 - 6.9	8 - 15.1	4.9 - 5.6	
TC (mg%)	mean $\pm$ SD	178.23 $\pm$ 55.66	170.5 $\pm$ 27.95	179 $\pm$ 47.42	176.07 $\pm$ 11.81	0.929
	range	16 - 297	129 - 224	125 - 292	150 - 190	
HDL (mg%)	mean $\pm$ SD	54.38 $\pm$ 30.13	62.65 $\pm$ 17.9	58.45 $\pm$ 9.29	49.93 $\pm$ 7.67	0.007
	range	19 - 181	29 - 97	40 - 78	40 - 68	
LDL (mg%)	mean $\pm$ SD	95.38 $\pm$ 44.1	92.1 $\pm$ 20.96	99 $\pm$ 35.52	82.14 $\pm$ 17.65	0.543
	range	30 - 206	45 - 124	44 - 182	60 - 115	
TG (mg%)	mean $\pm$ SD	297.93 $\pm$ 319.63	62.65 $\pm$ 17.9	112.7 $\pm$ 72.24	99.86 $\pm$ 27.72	<0.001
	range	53 - 1800	34 - 139	41 - 328	58 - 156	

*NDM1, patients with newly diagnosed diabetes; DM1w, patients with long-term diabetes who are metabolically well-controlled; DM1n, patients with long-term diabetes; metabolically poorly controlled; BMI, body mass index; HbA1c, glycated hemoglobin A1c; TC, cholesterol; TG, triglycerides. Data are expressed as mean $\pm$ SD.



mL, $p=0.046$) and lower than in healthy children (11.19 ± 52.16 vs 20.94 ± 23.29 ng/mL, $p<0.001$). Furthermore, children in the DM1w group had statistically lower levels of this hormone than healthy children (5.11 ± 8.59 vs 20.94 ± 23.29 ng/mL, $p=0.004$, Figure 1). The level of bioLEP was statistically increased in children with NMD1 compared to children in the DM1n group (17.2 ± 83.66 vs 11.33 ± 11.03 ng/mL, $p=0.002$) and lower than in healthy children (17.2 ± 83.66 vs 20.86 ± 21.16 ng/mL, $p<0.001$). The bioLEP level in the participants in the DM1w group was 7.84 ± 12.45 ng/ml and did not differ statistically from other study groups.

Individual bioLEP/LEP quotients in children with NDM1 were significantly decreased compared to children in the DM1w and DM1n group (1.28 ± 0.52 vs. 1.72 ± 0.43 , $p<0.05$ and 1.63 ± 0.38 , $p<0.05$, respectively). The ratio of bioLEP to leptin in the group of

healthy children was close to 1 (1.03 ± 0.19) and was statistically lower than in the DM1w and DM1n groups ($p<0.001$).

Table 2 presents differences in leptin, bioLEP, and bioLEP/leptin levels depending on the sex of the study participants. There were no statistical differences in the levels of leptin, bioLEP, and bioLEP/leptin among children with NDM1. Both in the DM1w and DM1n group, leptin and bioLEP were higher in girls than in boys. There was no difference in bioLEP/leptin in either group. Surprisingly, leptin and bioLEP levels were higher in healthy boys than in girls. Individual quotients of bioLEP/LEP in healthy boys and girls were close to 1.

Tables 3, 4 present the level of leptin and bioLEP depending on the BMI percentiles. Children below the third percentile were only in the NDM1 group. Among children of normal weight, leptin levels

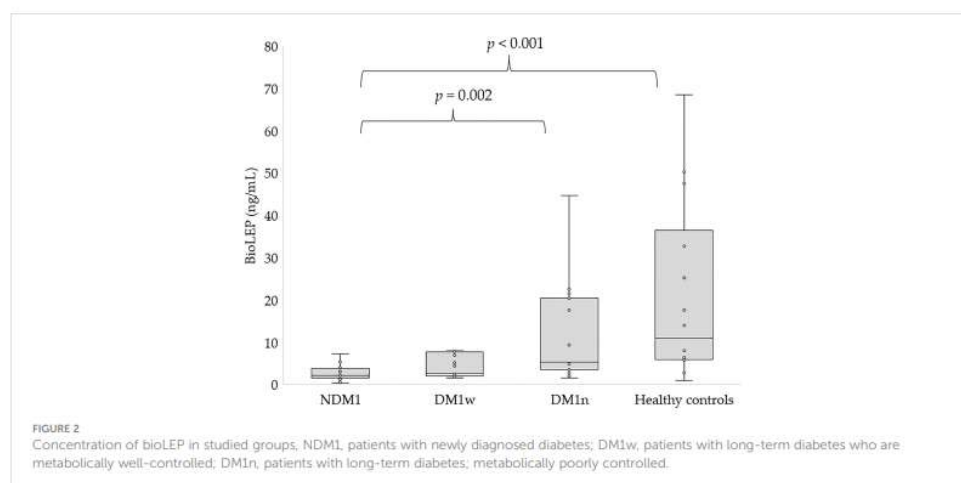


TABLE 2 Leptin parameters depending on the sex of the participants.*.

		Leptin, ng/mL	BioLEP, ng/mL	BioLEP/Leptin
NDM1	Boys	14.28 ± 61.22	3.99 ± 5.86	1.18 ± 0.43
	Girls	3.06 ± 3.59	52.03 ± 159.25	1.55 ± 0.67
	<i>p</i>	0.906	0.431	0.134
DM1w	Boys	2.07 ± 1.33	3.29 ± 2	1.69 ± 0.44
	Girls	12.21 ± 13.75	18.45 ± 19.64	1.78 ± 0.53
	<i>p</i>	0.063	0.029	0.773
DM1n	Boys	2.76 ± 2.04	4.19 ± 2.28	1.63 ± 0.44
	Girls	11.83 ± 8.71	17.18 ± 11.97	1.62 ± 0.33
	<i>p</i>	0.019	0.008	0.879
Healthy controls	Boys	34.03 ± 34.77	33.99 ± 30.44	1.05 ± 0.34
	Girls	13.67 ± 10.5	13.56 ± 9.84	1.02 ± 0.07
	<i>p</i>	0.689	0.594	0.505

*NDM1, patients with newly diagnosed diabetes; DM1w, patients with long-term diabetes who are metabolically well-controlled; DM1n, patients with long-term diabetes; metabolically poorly controlled.

were significantly different between healthy children and children with newly diagnosed diabetes, as well as participants from the DM1w group. We did not observe any difference in leptin levels between the other groups of children with a BMI between the third and 85th percentiles, and between children above the 85th percentile. Among children with newly diagnosed diabetes, leptin levels were significantly different between underweight, overweight, and obese children ($p < 0.001$). Moreover, children of normal weight had statistically lower leptin levels than children with a BMI above the 85th percentile ($p = 0.003$). In the group of children with DM1w and DM1n, there were no differences in leptin levels between children with normal weight and children with a BMI greater than the 85th percentile ($p = 0.122$ and $p = 0.096$, respectively). Moreover, there were no differences in the level of this hormone between the groups in the control group ($p = 0.291$).

The level of bioLEP was significantly different between children in the NDM1 group and healthy children and children in the DM1n group. In the NDM1 group, the level of bioLEP was significantly higher in children with normal weight and overweight and obese than in the group of underweight children ($p = 0.037$ and $p < 0.001$, respectively). Moreover, children with a BMI between the 3rd and

85th percentiles had significantly lower bioLEP levels than overweight and obese children ($p = 0.013$).

In the group of children with DM1w and DM1n, there was no difference in bioLEP levels between children with normal weight and children with a BMI above the 85th percentile ($p = 0.177$ and $p = 0.157$, respectively). In addition, there was no difference in the level of this hormone between the groups in the control group ($p = 0.368$).

The dependence between leptin and bioLEP level and patient general characteristics was estimated using Spearman's correlation. Spearman rank correlation coefficients and p values for each separate disease are presented in Tables 5, 6. We found a strong positive correlation between leptin level and weight and BMI in children with NDM1 and healthy controls ($R = 0.524$, $p < 0.001$; $R = 0.7$, $p < 0.001$ and $R = 0.59$, $p = 0.025$; $R = 0.6$, $p = 0.023$, respectively). In addition, in the group of children with DM1n there was a moderate and positive correlation between leptin and total cholesterol and LDL level. No other association was demonstrated between leptin concentration and other parameters analyzed.

Regarding bioLEP, we observed a strong positive correlation between bioLEP level and weight and BMI in children with newly

TABLE 3 Concentration of leptin depending on the BMI percentile.*.

BMI	NDM1	DM1w	DM1n	HC	<i>p</i>	<i>p</i> NDM1/ HC	<i>p</i> DM1w/ HC	<i>p</i> DM1n/ HC	<i>p</i> NDM1/ DM1w	<i>p</i> NDM1/ DM1n	<i>p</i> DM1w/ DM1n
<3 rd	1.21 ± 0.43	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3-85 th	2.25 ± 2.38	3.41 ± 4.28	5.24 ± 5.58	18.33 ± 23.74	<0.001	<0.001	0.005	0.459	0.999	0.253	0.716
>85 th	63.09 ± 131.85	11.94 ± 17.26	12.42 ± 9.93	30.48 ± 23.08	0.479	0.999	0.755	0.999	0.999	0.999	0.999

*NDM1, patients with newly diagnosed diabetes; DM1w, patients with long-term diabetes who are metabolically well-controlled; DM1n, patients with long-term diabetes; metabolically poorly controlled; HC, healthy controls.

TABLE 4 Concentration of bioLEP depending on the BMI percentile.*.

BMI	NDM1	DM1w	DM1n	HC	<i>p</i>	<i>p</i> NDM1/ HC	<i>p</i> DM1w/ HC	<i>p</i> DM1n/ HC	<i>p</i> NDM1/ DM1w	<i>p</i> NDM1/ DM1n	<i>p</i> DM1w/ DM1n
<3 rd	1.15 ± 0.53	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3–85 th	22.42 ± 101.88	5.46 ± 6.46	8.04 ± 7.51	18.66 ± 21.7	<0.001	0.002	0.151	0.999	0.999	0.031	0.983
>85 th	63.09 ± 131.85	17.34 ± 24.95	17.45 ± 14.32	28.92 ± 20.8	0.63	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999

*NDM1, patients with newly diagnosed diabetes; DM1w, patients with long-term diabetes who are metabolically well-controlled; DM1n, patients with long-term diabetes; metabolically poorly controlled; HC, healthy controls.

diagnosed diabetes ($R=0.487$, $p<0.001$ and $R=0.706$, $p<0.001$). Furthermore, the association of bioLEP with BMI, total cholesterol, LGL, and triglycerides had a moderate and increasing trend in children with DM1n (Tab. 5). BioLEP levels were positively correlated with HDL ($R=0.559$, $p=0.038$) and negatively correlated with LDL ($R=-0.54$, $p=0.046$) in healthy children.

We did not find any additional associations between other analyzed parameters. The level of leptin and bioLEP strongly correlated with each other in all study groups (Table 7).

4 Discussion

In the current study, leptin and bioLEP concentrations were assessed in children with type I diabetes and healthy children. Lower levels of leptin were found in children with diabetes compared to healthy children. Moreover, we found a statistically higher concentration of leptin in the group of children with newly diagnosed diabetes compared to children in the diabetic group with poor metabolic control and a decrease than in healthy children. Moreover, children from the metabolically well-controlled group had statistically lower levels of this hormone than healthy children. Hanaki et al. showed lower levels of leptin in newly diagnosed children with DM1 compared to healthy children (3.3 ± 0.2 vs 6.2 ± 0.9 ng/mL; $p<0.005$), and its level increased with the use of insulin

treatment (14). Similarly, serum from newly diagnosed children with diabetes had significantly lower levels of leptin (mean 1.28 ± 1.60 ng/ml) compared to healthy children (mean 2.2 ng/ml) in the study by Kiess et al. (10). Contrary to our results, Morales et al. showed higher serum leptin levels in children with DM1 compared to healthy children (5.1 vs 2.7 ng/mL) (15). Insulin treatment increases leptin levels (5.18 ± 5.48 ng/ml) in children with newly diagnosed diabetes, which is consistent with our results (10). However, among our patients, leptin levels in children with well-controlled DM1 were significantly lower than in healthy controls (5.11 ± 8.59 vs 20.94 ± 23.29 ng/mL). Leptin plays an essential role in maintaining body weight and glucose homeostasis (16). This is done by its central and peripheral actions. There is a direct relationship between leptin and insulin. The presence of leptin receptors in pancreatic beta cells indicates the involvement of leptin in the pancreatic endocrine system, including the regulation of insulin secretion by beta cells. It is assumed that insulin increases the production of leptin by adipose tissue, while leptin inhibits insulin secretion and insulin gene expression. The repressive effect of leptin on insulin production is regulated both by the autonomic nervous system and directly by affecting leptin receptors in beta cells (17). Leptin can inhibit basal and glucose-stimulated insulin secretion (18). This occurs through several mechanisms, including the activation of ATP-dependent potassium channels resulting in membrane hyperpolarization and suppression of insulin secretion (19–21). The above-mentioned

TABLE 5 Spearman's rank correlation coefficients and *p* values for leptin.*.

	NDM1		DM1w		DM1n		HC	
	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>
Age	0.291	0.068	-0.014	0.952	0.099	0.678	-0.120	0.684
Weight	0.524	<0.001	0.113	0.636	0.146	0.537	0.594	0.025
BMI	0.7	<0.001	0.26	0.268	0.444	0.05	0.6	0.023
Hb1Ac	0.163	0.315	0.226	0.338	0.074	0.757	0.083	0.778
TC	-0.0437	0.788	0.195	0.409	0.47	0.036	-0.212	0.468
HDL	-0.0166	0.919	0.142	0.55	0.33	0.155	0.528	0.053
LDL	0.223	0.166	0.093	0.696	0.517	0.02	-0.498	0.07
TG	-0.001	0.998	0.049	0.838	0.411	0.072	0.311	0.28

*NDM1, patients with newly diagnosed diabetes; DM1w, patients with long-term diabetes who are metabolically well-controlled; DM1n, patients with long-term diabetes; metabolically poorly controlled; HC, healthy controls.

TABLE 6 Spearman's rank correlation coefficients and p values for bioLEP.*.

	NMD1		DM1w		DM1n		HC	
	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>
Age	0.230	0.154	-0.13	0.585	0.137	0.563	-0.183	0.531
Weight	0.487	<0.001	-0.03	0.902	0.155	0.512	0.491	0.075
BMI	0.706	<0.001	0.107	0.654	0.490	0.028	0.459	0.098
Hb1Ac	0.181	0.263	0.262	0.265	0.109	0.646	0.110	0.708
TC	-0.034	0.834	0.277	0.238	0.492	0.028	-0.331	0.248
HDL	-0.096	0.558	0.078	0.743	0.325	0.162	0.559	0.038
LDL	0.214	0.186	0.275	0.240	0.577	0.008	-0.54	0.046
TG	0.038	0.817	0.058	0.808	0.495	0.027	0.278	0.337

*NDM1, patients with newly diagnosed diabetes; DM1w, patients with long-term diabetes who are metabolically well-controlled; DM1n, patients with long-term diabetes; metabolically poorly controlled; HC, healthy controls.

TABLE 7 Spearman's rank correlation coefficients and p values for leptin and bioLEP.

	NDM1	DMw	DMn	HC
R	0.876	0.895	0.948	0.982
p	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001

relationships may explain the decreased level of leptin in patients with insulin deficiency during the course of type 1 diabetes.

In addition, the present study showed a significant correlation between leptin concentration and BMI. Among children with newly diagnosed DM1, leptin concentrations differed significantly between underweight, overweight, and obese children. Additionally, in the NDM1 group, children with normal body weight had statistically lower leptin levels than children with BMI above the 85th percentile. In the group of children with DM1w and DM1n, there were no differences in leptin concentration between children with normal weight and children with BMI above the 85th percentile. In addition, there was no difference in the level of this hormone between the groups according to BMI in the control group. In studies by Soliman et al., higher levels of leptin were observed in children with a higher BMI (22). Kiess et al. also found a positive correlation between leptin and BMI ($R=0.42$, $p<0.0001$) (10). In overweight patients with DM1, leptin showed a significant positive correlation with hip circumference and BMI (23).

As in the studies by Morales et al. and Kiess et al., no correlation were found between leptin concentration and HbA1c level and lipid metabolism parameters in children with NDM1 (10, 15). In the group of children with DM1n, a moderate and positive correlation was found between leptin level and total cholesterol and LDL was found. In the conducted studies, similarly to the study by Kratzsch et al., no significant differences were found in terms of leptin concentration and severity of acid-base disturbances (24).

Recent studies have shown that mutations in the leptin gene can lead to leptin dysfunction. Congenital leptin deficiency is characterized by excessive appetite and severe early obesity, as well as metabolic and endocrine disorders. The disease is caused by mutations in the leptin gene, which usually lead to defects in leptin synthesis, and thus to the

absence or very low levels of this hormone in the circulation (25). Functional leptin deficiency is characterized by high levels of circulating immunoreactive leptin, but decreased hormone bioactivity due to defective receptor binding. Mutations in the leptin gene have been described in obese patients in whom circulating immunoreactive leptin levels were detectable while bioLEP levels were low. The use of recombinant human leptin led to a rapid improvement in eating behavior and weight loss (11, 26).

To our knowledge, this is the first study to describe bioLEP levels among children with DM1 with different forms of disease control. In our study, the level of bioLEP differed significantly between the children of the NDM1 group (17.2 ± 83.66 , range: 0.33–532 ng/mL) and the children of the DM1n group (11.33 ± 11.03 , range: 1.58–44.63 ng/mL) and healthy controls (20.86 ± 21.16 , range: 0.99–68.47 ng/mL). Moreover, children with NDM1 compared to children with DM1n have lower levels of leptin but higher levels of bioLEP. In the NDM1 group, the level of bioLEP was significantly higher in children with normal weight and overweight and obese than in the group of underweight children. Furthermore, children with a BMI between the 3rd and 85th percentiles had significantly lower bioLEP levels than overweight and obese children. In the group of children with DM1w and DM1n, there were no differences in bioLEP levels between children with normal weight and children with BMI greater than the 85th percentile. Additionally, there were no differences in the level of this hormone between the groups in the control group. BioLEP was correlated with BMI among children with NDM1 and DM1N. This correlation was at a level comparable to the correlation between total LEP and BMI. Furthermore, the hormone was positively correlated with LDL and glycerides among children with poor diabetes control. Interestingly, bioLEP was positively correlated with HDL and negatively with LDL among healthy children. BioLEP levels were

positively correlated with age and BMI among children with severe early-onset obesity (12). The better concentration of bioLEP than total leptin might reflect the amount of hormone that is capable of exerting a biological effect (27). Niklowitz et al. found that bioLEP levels did not differ between prepubertal girls and boys, while we observed a trend for higher bioLEP levels in girls compared to boys with DM1w and DM1n (27). Similar observations have recently been made among obese children (12).

Insulin deficiency in type 1 diabetes results in a state of increased lipolysis of adipocytes, which causes an increase in circulating free fatty acids and ultimately ketonemia. Both of these metabolites can reduce the ability of adipocytes to secrete leptin, signaling an “energy deficit.” Therefore, type 1 diabetes is a condition in which one can speak of a “relative leptin deficiency” (28). Experimental studies and clinical observations indicate a relationship between insulin and leptin release (29). Despite many studies published in recent years, many aspects of leptin secretion, action, and mechanisms of its influence on carbohydrate and fat metabolism are still to be clarified. In our opinion, studies evaluating the status of bioLEP in diabetes may also contribute to a better understanding of the mechanisms that regulate metabolism. Many studies have suggested that leptin can be used as an antidiabetic drug or in addition to insulin therapy in patients with insulin-dependent diabetes (30–33). The results of experimental studies are encouraging; however, the use of such a therapy in humans requires further clinical trials.

5 Conclusion and limitation

Although our study provides new information on leptin and bioLEP among pediatric patients with varying degrees of DM1 control, several limitations of the study should be mentioned. First, this study is a single-center study with a small group of children. The COVID-19 pandemic prevented us from collecting a larger group of patients. Second, we did not analyze the soluble leptin receptor in the serum of the participants. Therefore, further research is needed containing larger groups of patients differing in sex, age, and degree of sexual maturation.

References

1. Lawrence JM, Divers J, Isom S, Saydah S, Imperatore G, Pihoker C, et al. Trends in prevalence of type 1 and type 2 diabetes in children and adolescents in the US, 2001–2017. *JAMA* (2021) 326:717–27. doi: 10.1001/jama.2021.11165
2. Xu G, Liu B, Sun Y, Du Y, Snetelaar LG, Hu FB, et al. Prevalence of diagnosed type 1 and type 2 diabetes among US adults in 2016 and 2017: population based study. *BMJ* (2018) 362:k1497. doi: 10.1136/bmj.k1497
3. Houseknecht KL, Baile CA, Mattern RL, Spurlock ME. The biology of leptin: A review. *J Anim. Sci* (1998) 76:1405–20. doi: 10.2527/1998.7651405x
4. Obradovic M, Sudar-Milovanovic E, Soskic S, Essack M, Arya S, Stewart AJ, et al. Leptin and obesity: role and clinical implication. *Front Endocrinol* (2021) 12:585887. doi: 10.3389/fendo.2021.585887
5. Meek TH, Morton, Leptin GJ. Diabetes, and the brain. *Indian J Endocrinol Metab* (2012) 16:S534–42. doi: 10.4103/2230-8210.105568
6. Morrison CD. Leptin signaling in brain: A link between nutrition and cognition? *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* (2009) 1792:401–8. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.12.004
7. Marques-Oliveira GH, Silva TM, Lima WG, Valadares HMS, Chaves VE. Insulin as a hormone regulator of the synthesis and release of leptin by white adipose tissue. *Peptides* (2018) 106:49–58. doi: 10.1016/j.peptides.2018.06.007
8. Zhao Y, Li H. Association of serum leptin and insulin levels among type 2 diabetes mellitus patients: A case-control study. *Med (Baltimore)* (2022) 101:e31006. doi: 10.1097/MD.00000000000031006
9. Liu W, Zhou X, Li Y, Zhang S, Cai X, Zhang R, et al. Serum leptin, resistin, and adiponectin levels in obese and non-obese patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Med (Baltimore)* (2020) 99:e19052. doi: 10.1097/MD.00000000000019052
10. Kiess W, Anil M, Blum WF, Englaro P, Juul A, Attanasio A, et al. Serum leptin levels in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus in relation to metabolic control and body mass index. *Eur J Endocrinol* (1998) 138:501–9. doi: 10.1530/eje.0.1380501
11. Wabitsch M, Funcke J-B, von Schnurbein J, Denzer F, Lahr G, Mazen I, et al. Severe early-onset obesity due to bioinactive leptin caused by a p.N103K mutation in the leptin gene. *J Clin Endocrinol Metab* (2015) 100:3227–30. doi: 10.1210/jc.2015-2263

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Bioethics Committee of the University of Rzeszow (Poland) 2018/03/08. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants’ legal guardian/next of kin.

Author contributions

Conceptualization: KJ-K, JT and AM. Data curation: KJ-K. Formal analysis: SG. Investigation: KJ-K, KL, IK, AL and JT. Methodology: KJ-K. Project administration: KJ-K and AM. Resources: KJ-K. Software: SG. Supervision: AM. Writing-original draft: KJ-K and SG. Writing-review and editing: KJ-K, SG and AM. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher’s note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

12. Zachurzok A, Ranke MB, Flehmig B, Jakubek-Kipa K, Marcinkiewicz K, Mazur A, et al. Relative leptin deficiency in children with severe early-onset obesity (SEOO) - results of the early-onset obesity and leptin - german-polish study (EOL-GPS). *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM* (2020) 33:255–63. doi: 10.1515/jpem-2019-0469
13. International society for pediatric and adolescent diabetes. Available at: <https://www.ispad.org/> (Accessed 28 April 2023).
14. Hanaki K, Becker DJ, Arslanian SA. Leptin before and after Insulin Therapy in Children with New-Onset Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* (1999) 84:1524–6. doi: 10.1210/jcem.84.5.5653
15. Morales A, Wasserfall C, Brusko T, Carter C, Schatz D, Silverstein J, et al. Adiponectin and leptin concentrations may aid in discriminating disease forms in children and adolescents with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care* (2004) 27:2010–4. doi: 10.2337/diacare.27.8.2010
16. LeDuc CA, Skowronski AA, Rosenbaum M. The role of leptin in the development of energy homeostatic systems and the maintenance of body weight. *Front Physiol* (2021) 12:789519. doi: 10.3389/fphys.2021.789519
17. Marroqui L, Gonzalez A, Neco P, Caballero-Garrido E, Vieira E, Ripoll C, et al. Role of leptin in the pancreatic β -cell: effects and signaling pathways. *J Mol Endocrinol* (2012) 49:R9–17. doi: 10.1530/JME-12-0025
18. Hay N. Akt isoforms and glucose homeostasis - the leptin connection. *Trends Endocrinol Metab TEM* (2011) 22:66–73. doi: 10.1016/j.tem.2010.09.003
19. Lee Y, Magkos F, Mantzoros CS, Kang ES. Effects of leptin and adiponectin on pancreatic β -cell function. *Metabolism* (2011) 60:1664–72. doi: 10.1016/j.metabol.2011.04.008
20. Kim M-H, Kim H. Role of leptin in the digestive system. *Front Pharmacol* (2021) 12:660040. doi: 10.3389/fphar.2021.660040
21. Cochrane VA, Wu Y, Yang Z, ElSheikh A, Dunford J, Kievit P, et al. Leptin modulates pancreatic β -cell membrane potential through src kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptors. *J Biol Chem* (2020) 295:17281–97. doi: 10.1074/jbc.RA120.015489
22. Soliman AT, Omar M, Assem HM, Nasr IS, Rizk MM, El Matary W, et al. Serum leptin concentrations in children with type 1 diabetes mellitus: relationship to body mass index, insulin dose, and glycemic control. *Metabolism*. (2002) 51:292–6. doi: 10.1053/meta.2002.30502
23. Dayem SMAE, Kader MAE, Ibrahim S, Mokhtar E, Megeed EAE. Leptin and lipid profile in overweight patient with type 1 diabetes. *Open Access Maced. J Med Sci* (2017) 5:131–6. doi: 10.3889/oamjms.2017.033
24. Kratzsch J, Knerr I, Galler A, Kapellen T, Raile K, Körner A, et al. Metabolic decompensation in children with type 1 diabetes mellitus associated with increased serum levels of the soluble leptin receptor. *Eur J Endocrinol* (2006) 155:609–14. doi: 10.1530/eje.1.02261
25. Funcke J-B, von Schnurbein J, Lennerz B, Lahr G, Debatin K-M, Fischer-Posovszky P, et al. Monogenic forms of childhood obesity due to mutations in the leptin gene. *Mol Cell Pediatr* (2014) 1:3. doi: 10.1186/s40348-014-0003-1
26. Wabitsch M, Funcke J-B, Lennerz B, Kuhnle-Krahl U, Lahr G, Debatin K-M, et al. Biologically inactive leptin and early-onset extreme obesity. *N Engl J Med* (2015) 372:48–54. doi: 10.1056/NEJMoa1406653
27. Niklowitz P, Rothermel J, Lass N, Barth A, Reinehr T. Bioactive leptin is stronger related to parameters of fat mass and distribution than conventionally measured leptin: findings from a longitudinal study in obese children participating in a lifestyle intervention. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* (2018) 480:225–9. doi: 10.1016/j.cca.2018.02.020
28. Oral EA. Leptin for type 1 diabetes: coming onto stage to be (or not)? *Pediatr Diabetes* (2012) 13:68–73. doi: 10.1111/j.1399-5448.2011.00797.x
29. Tucholski K, Otto-Buczkowska E. The role of leptin in the regulation of carbohydrate metabolism. *Endokrynol. Pol* (2011) 62:258–62.
30. Kraus D, Herman MA, Kahn BB. Leveraging leptin for type 1 diabetes? *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* (2010) 107:4793–4. doi: 10.1073/pnas.1000736107
31. Wang M, Chen L, Clark GO, Lee Y, Stevens RD, Ilkayeva OR, et al. Leptin therapy in insulin-deficient type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* (2010) 107:4813–9. doi: 10.1073/pnas.0909422107
32. Kozakowski J, Dudek P, Zgliczyński W. Obesity-diabetes-endocrinopathy - the metabolic connection. *Eur J Clin Exp Med* (2022) 20:459–69. doi: 10.15584/ejcem.2022.4.12
33. Singer K, Pietropaolo M, Menon RK. Improving type 1 diabetes control with leptin-is this a game-changer? *Pediatr Diabetes* (2010) 11:216–7. doi: 10.1111/j.1399-5448.2010.00687.x

ORIGINAL PAPER

Methylation status of leptin receptor gene promoter in obese children

Katarzyna Jakubek-Kipa¹, Natalia Potocka², Marzena Skrzypa², Łukasz Dembinski³,
Izabela Zawlik², Artur Mazur^{1,2}

¹II Clinic of Paediatrics, Endocrinology and Diabetology, Clinical Hospital no. 2 in Rzeszow, Rzeszow, Poland

²Centre for Innovative Research in Medical and Natural Sciences, Faculty of Medicine, University of Rzeszow, Rzeszow, Poland

³Department of Paediatric Gastroenterology and Nutrition, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

ABSTRACT

Obesity in children is a growing problem in many countries around the world. Molecular processes have been identified that may lead to epigenetic patterns contributing to obesity, such as DNA methylation in promoters of specific genes. The leptin receptor gene (*LEPR*) has been associated with obesity, and the aim of our study was to evaluate the methylation status of the *LEPR* promoter in the white blood cells (WBC) of 50 children with obesity. Leptin receptor gene promoter methylation was analysed using Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA). In all patients, the *LEPR* promoter was found to be unmethylated. The results may indicate that methylation of CpG islands in the *LEPR* promoter is not associated with obesity in children.

KEY WORDS:

obesity, children, methylation.

INTRODUCTION

The problem of childhood overweight and obesity has become one of the main challenges for public health in many countries around the world. According to a recent World Health Organization (WHO) report, nearly 41 million children under the age of five years were overweight or obese. If this trend continues, the number of overweight or obese infants and young children globally could rise to 70 million by 2025 [1]. Obesity can affect every system in the body and can lead to many serious and potentially life-threatening conditions including cardiovascular disease, diabetes, and musculoskeletal disorders [2]. Therefore, it is important to elucidate the mechanisms of obesity that would help define novel targets for preventative interventions.

Among the causes of obesity in children and adolescents, genetic, hormonal, and environmental factors have been implicated. There is strong evidence for the involvement of genetic and environmental epigenetic factors in the development of obesity in children [3]. The genetic determinants of obesity have been of interest to researchers for many years. In 1994, the first direct evidence of a genetic role in the formation of obesity was reported in studies of the mouse obesity gene (*ob*) and its product protein leptin [4]. The obesity gene locus was found to be located in humans on the q31.3 section of chromosome 7 [5, 6]. Subsequent studies have identified the leptin receptor as belonging to the family of class I cytokine receptors, and its gene has been cloned [6–8]. Detection of the *ob* gene has demonstrated that adipose tissue performs important regulatory functions

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:

Katarzyna Jakubek-Kipa, II Clinic of Paediatrics, Endocrinology and Diabetology, Clinical Hospital no. 2
in Rzeszow, 60 Lwowska St., 35-301 Rzeszow, Poland, ORCID: 0000-0003-2314-6398, e-mail: k_jakubek@op.pl

in the body because the leptin concentration is directly proportional to the body fat mass. Leptin is a multidirectional protein with neurohormonal, metabolic, and immunomodulatory functions [9–12]. Leptin activity at the cellular level is associated with the presence of membrane receptors (Ob-R, also known as *LEPR*) that are widespread in targeted organs (brain tissue, heart, lungs, kidneys, liver, pancreas, intestines, placenta, gonads, spleen, and thymus). The membrane receptor is a glycoprotein similar in structure to the class I cytokine receptors. The gene coding for the leptin receptor is located on chromosome 1p32 and is responsible for the synthesis of at least five isoforms: long (long form-OB-Rb) – which can transmit an intracellular signal, three short (OB-Ra, OB-Rc, OB-Rd), and one isoform of a soluble receptor (OB-Re). Within the OB-Rb isoform, present in the extracellular domain, are binding sites for leptin, and in the transcellular domain, sites of interaction for Janus kinase (JAK) and signal proteins STAT (signal transducers and activators of transcription) [10, 13–17]. The Ob-Re short isoform is a form of the receptor lacking endothelial and intracellular subunits. According to some researchers, it is a secretory isoform deprived of the ability to transduce signal and thus not playing a role in the biological function of leptin and only acting as a transporter (as leptin binding protein) of this hormone in the blood serum, while promoting its biostability. Currently, only long isoforms are considered as functional receptors of leptin, and in particular, the Ob-Rb isoform represented in the hypothalamus, which can participate in the transmission of the cellular signal where the anorectic action of leptin is expressed the most [18]. Leptin has, therefore, a weight-controlling effect, which is conditioned by both the normal structure of the hormone itself and the functionality of its receptor.

Recent years have brought the discovery of epigenetic mechanisms that play a key role in adapting the phenotype under the influence of environmental factors without changing the genetic code. The term epigenetics describes processes that alter gene expression without modifying the primary DNA sequence [19–21]. These changes include DNA methylation, histone modifications (i.e. acetylation, phosphorylation, ubiquitination) and synthesis of non-coding microRNAs (miRNAs). The most common epigenetic change is DNA methylation, which involves the transfer of a methyl group ($-\text{CH}_3$) from the donor – most commonly S-adenosyl methionine (SAM) to the carbon atom at the 5-position of the cytosine pyrimidine ring, in a reaction catalysed by methyltransferase DNA [24]. S-adenosyl methionine arises through the direct activation of methionine supplied with food or as a result of homocysteine transformations involving folates. This process takes place with the participation of DNA methyltransferase: DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B. Methyltransferases are re-

sponsible for *de novo* methylation and methylation associated with the transmission of epigenetic information to daughter cells arising after mitotic division [23]. In mammals, methylation of cytosine occurs almost entirely within the dinucleotide CpG (cytosine-phosphate-guanine). This cytosine methylation is a frequent method of epigenetic communication used by cells to “turn on and off” genes. Methylation changes the ability to transcribe genes without modifying the basic DNA sequence. Abnormal DNA methylation relies on hypermethylation or hypomethylation of the CpG sequence. Hypermethylation leads to the repression of transcription, while hypomethylation induces the transcription activation in silent genes [22]. Methylation is a process dependent on co-factors and donors of methyl groups.

Leptin plays an important role in body-weight regulation, and this mechanism is due to both the normal structure of the hormone and the function of its receptor. Abnormalities in leptin production and leptin receptor insensitivity often lead to overweight and obesity [24]. The purpose of this study was to determine whether *LEPR* methylation at the promoter region is associated with the occurrence of obesity in children.

MATERIAL AND METHODS

Fifty obese and overweight children hospitalised in the Department of Paediatric Endocrinology were enrolled in the study. In all children, the secondary cause of obesity was excluded. All children were weighed and measured in their underwear three times, and the mean of these measurements was calculated. The measurements were carried out with the use of a RADWAG WPT 60/150 device (RADWAG, Radom, Poland). Body mass index (BMI) was calculated, and children were classified as obese based on age and gender BMI percentiles according to the Polish OLAF study [25]. Overweight was defined as BMI > 85 pc and obesity > 95 pc. Data on overweight and obesity in parents was also collected.

The study group included 26 girls (25 with obesity, one overweight) and 24 boys (16 with obesity, eight overweight) between 4 and 16 years of age (SD 7.67 $\pm$ 4.50). The differences in boys' and girls' group sizes were statistically not significant ($p < 0.05$). Also, differences between the ages of both groups were statistically not significant ($p < 0.05$). The average BMI of children participating in the study was 28.7 kg/m² (SD 29.1 $\pm$ 9.21).

Some of children in this study were also diagnosed with hypercholesterolaemia (six boys and seven girls) and hypertriglyceridaemia (two boys and two girls). Two children, on the basis of oral glucose tolerance test (OGTT), were diagnosed with impaired glucose tolerance. Insulin resistance was defined in the HOMA-IR (value > 2.67 in boys and > 2.22 in girls before puberty, and at puberty > 5.22 in boys and > 3.82 in girls). Insulin resistance was

TABLE 1. Primer design for PCR-based methylation analysis

Gene name	Primer sequences	Product size (bp)
<i>LEPR</i>	Forward primer: GTTATGTGAAGGTAGATAGG Reverse primer: CAACCCAATACCTAAACCC	330

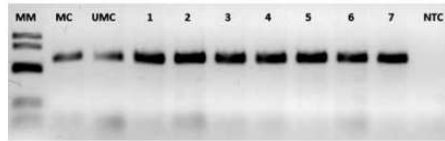


FIGURE 1. Polymerase chain reaction (PCR)-amplification of *LEPR*. Amplicons were analysed by 2% agarose gel electrophoresis. MM: DNA molecular mass marker (500, 400, 250, 100, 50 bp); MC: methylated control DNA; UMC: unmethylated control DNA; 1–7 samples from obese children; NTC: negative template control. PCR product 330 pz

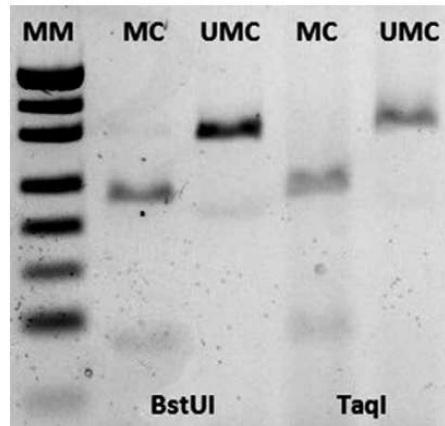


FIGURE 2. Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) of *LEPR*. PCR amplicons were subjected to restriction analysis with BstUI resulting in 232 and 98 bp fragments (lane 2, 3), TaqI resulting in 234 and 96 bp fragments (lane 4, 5). MM: DNA molecular mass marker (501, 404, 331, 242, 190, 147, 110, 67 bp); MC: methylated control DNA; UMC: unmethylated control DNA

found in four boys and three girls. In 28 children, obesity also affected their parents; nine of 28 children had both an obese mother and father.

METHYLATION ANALYSIS

Peripheral blood was collected from 50 patients. The leptin receptor promoter methylation (*LEPR*) was analysed

using the Combined Bisulphite Restriction Analysis (COBRA) method. The method was designed using the MethPrimer software 2.0, which allows designing primers for bisulphite-conversion-based PCR and predicting CpG islands in DNA sequences [26]. Our results were checked using the BiSearch Primer Design and Search Tool to avoid non-specific amplification products [27]. For the analysis, the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) was used to isolate and purify DNA from whole blood. Measurement of the concentration and quality of the isolated DNA was performed by a spectrophotometric method. Bisulphite conversion was performed using the EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research). Converted DNA (50 ng) was stored at -20°C and amplified using TaKaRa EpiTaq[™] HS (for bisulphite-treated DNA) (Clontech) as follows: $1 \times$ buffer, 0.2 mM dNTPs, 1.75 mM MgCl_2 , 0.5 U polymerase, and 0.5 μM designed primers (Table 1) in a total volume of 20 μl . The optimal conditions were determined to be: initial denaturation at 94°C for 15 min followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 57°C for 45 s, extension at 72°C for 45 s, with a final extension at 72°C for 7 min. PCR amplifications were performed in a (T100[™] Thermal Cycler) thermal cycler (Bio-Rad). The amplification products were separated by electrophoresis through 2% agarose gel (PB Genoplast Biochemicals) and stained with Midori Green Stain (Nippon Genetics). For the promoter of the receptor leptin, a single band of 330 bp was observed (Fig. 1). Next, 5 and 7 μl of PCR product was used to perform a restriction digest of the amplified sequence. EpiTect Control DNAs, completely methylated, and completely unmethylated bisulphite converted DNAs were used for DNA methylation analysis. For the restriction analysis, two restriction enzymes were used: BstUI (ThermoFisher) and TaqI (ThermoFisher). Restriction digestions were performed using 10 U of BstUI and 10 U of TaqI in a total volume of 16 μl at 65°C for 18 h. After this, the reaction was stopped by incubation at 80°C for 20 min. The digestion reaction products (15 μl) were electrophoresed in a 3% high-resolution agarose gel (Blirt DNA) and visualised by Midori Green staining. For the methylated regions, two bands were observed: 98 bp and 232 bp for BstUI or 96 bp and 234 bp for TaqI (Fig. 2).

This study was conducted according to the Declaration of Helsinki on "Ethical Principles for Medical research in Humans" and has the approval of the Ethics Committee of the University of Rzeszow, Poland.

RESULTS

Samples were analysed from 50 children with obesity. Restriction analysis using BstUI and TaqI enzymes did not bind the cutting sites in any sample (Figs. 3 and 4), nor were there differences in the methylation of the *LEPR* promoter region for two sites CpG.

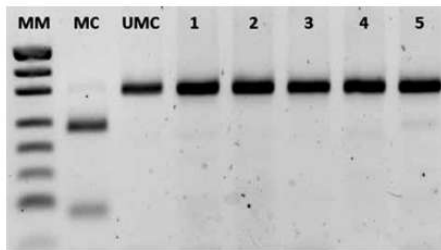


FIGURE 3. COBRA assay using BstUI enzyme to detect methylation of CpG site in the leptin receptor promoter region. The sample 1–5 (lane 4–8), lane 1: MM – DNA molecular mass marker (501, 404, 331, 242, 190, 147, 110, 67 bp); lane 2: MC – methylated control DNA; lane 3: UMC – unmethylated control DNA. No restriction enzyme cutting site, electrophoresis in 3% gel HR agarose

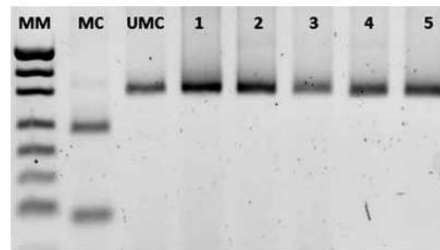


FIGURE 4. COBRA assay using TaqI enzyme to detect methylation of CpG site in the leptin receptor promoter region. The sample 1–5 (lane 4–8), lane 1: MM – DNA molecular mass marker (501, 404, 331, 242, 190, 147, 110, 67 bp); lane 2: MC – methylated control DNA; lane 3: UMC – unmethylated control DNA. No restriction enzyme cutting site, electrophoresis in 3% gel HR agarose

DISCUSSION

Epigenetic regulation of the leptin signalling circuit could be a potential mechanism of leptin function disturbance.

The aim of this research project was to assess the incidence of epigenetic changes in the methylation of the *LEPR* gene in obese children. So far, this problem has rarely been addressed in the literature; most studies have focused on the epigenetic influences in the leptin gene alone.

Recent studies have demonstrated that leptin promoter methylation plays an important role in leptin expression. *In vivo* studies in humans and mice have indicated that leptin promoter methylation is normally imposed during postzygotic development and that this epigenetic mark may function in modulating the leptin expression [29]. Melzner *et al.* reported that CpGs in the proximal leptin promoter was highly methylated in pre-adipocytes. During maturation toward terminally differentiated adipocytes, this promoter region was found to be highly demethylated [28]. This suggests that the methylation of CpGs inhibits leptin expression, whereas demethylation activates leptin expression. Therefore, it was interesting to assess the methylation status of the leptin receptor gene in obese children. Plagemann *et al.* and Krechowec *et al.* suggest that prenatal nutrition can shape future susceptibility to obesity through alterations in leptin sensitivity and changes in energy metabolism during adult life. Humans lacking leptin or functional leptin receptors develop severe obesity and hyperphagia [30, 31]. Moreover, the manipulation of the postnatal diet has been shown to limit the adverse outcomes of foetal programming, as a postnatal diet enriched with n-3 fatty acids prevented pre-programmed hyperleptinaemia and hypertension [32]. Khalyfa *et al.* showed in a mouse model that staying on a high-fat diet in late pregnancy leads to an increased risk of insulin resistance and hyperlipidaemia resulting

from epigenetic changes, i.e. an increase in the methylation of adiponectin and leptin receptors, and a decrease in leptin gene methylation in offspring [34].

In the recent study, Glendining *et al.*, in an animal model, found that diet-induced maternal obesity upregulates *LEPR* expression in the female offspring hippocampus and can alter histone binding at the *LEPR* promoter [33]. In this study *in vitro* IL-6 reproduced epigenetic deregulation of *LEPR* in hippocampal neurons from females and not males.

In our study, we examined the methylation status in the promoter of the leptin receptor. We tested *LEPR* promoter in peripheral blood white cells in obese school children and found no evidence of methylation. In our study, methylation of the *LEPR* promoter region in two CpG sites was not observed. The results obtained by us showed no correlation between the level of methylation of the leptin receptor gene and BMI.

In an analysis of the results of our research, we offer several explanations that might account for the lack of detection of methylated DNA in our study. Perhaps the methylation of other CpG islands in the leptin receptor gene promoter regulates its expression, leading to the exclusion of this gene and, consequently, leptin dysfunction in energy regulation leading to overweight and obesity. It is possible that changes could not be identified because the tested material collected from children was blood and not fat tissue. The most desirable tissue for methylation status studies would be adipose tissue, and more precisely adipocytes. However, the process of obtaining these cells for research remains difficult because the accessibility of tissues such as fat from biopsies is difficult and painful. Dunstan *et al.* measured methylation status in saliva. The results suggest that saliva may be a useful tissue for large-scale studies of epigenetics concerning obesity and the *LEPR* gene. This study showed an association between DNA methylation in each CpG site of the *LEPR* gene with

obesity-related measures in children aged 10–15 years. In addition, parental BMI was associated with both leptin methylation and obesity [36]. High-throughput identification of methylation patterns in various tissues would make it possible to establish genome-wide epigenetic profiles and to correlate them with the vulnerability of an individual to diseases and obesity [35].

LIMITATIONS

The lack of DNA methylation may be due to the selection of a method in which only two CpG sites in the leptin receptor gene promoter were tested. It can be assumed that epigenetic changes may occur in other CpG islands. Another limitation may also be the fact that the material for testing was blood (the DNA was isolated from white blood cells – WBC) rather than adipose tissue. The studies were carried out in a population of children, and perhaps exposure to an unhealthy high-fat diet for a longer time is necessary for the methylation process. It would be warranted to assess the methylation status of the CpG islands in the same patients in several years if they, unfortunately, do not curb their eating habits and are still obese. We also think that the use of a complementary research method such as the microarray method would allow for further verification of our results.

CONCLUSIONS

Our results indicate that the *LEPR* promoter in the CpG islands isolated from WBC is not methylated in obese children. To gain insight into the link between methylation status in the promoter region of the leptin receptor gene in obese children, more detailed studies of the epigenetic changes associated with leptin resistance in obesity are warranted.

DISCLOSURE

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. World Health Organization. Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health. Available at: <https://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/en/> (accessed: March 31, 2020).
2. Raj M, Kumar RK. Obesity in children & adolescents. *Indian J Med Res* 2010; 132: 598–607.
3. Herrera BM, Keildson S, Lindgren CM. Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas* 2011; 69: 41–49.
4. Zhang YY, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homolog. *Nature* 1994; 372: 425–432.
5. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997; 387: 903–908.
6. Strobel A, Issa T, Camoin L, et al. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 1998; 18: 213–215.
7. Ozata M, Ozdemir IC, Licinio J. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: Multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3686–3695.
8. Clement K, Vaisse C, Lahlou N, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998; 392: 398–401.
9. Fernández-Riejos P, Najib S, Santos-Alvarez J, et al. Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 568343.
10. Kumor A, Maciak I, Kozak-Michałowska I. Leptyna. Hormon o wielokierunkowym działaniu. *Diag Lab* 2004; 40: 179–190.
11. Strążyńska A, Bryl W, Hoffmann K. Ocena stężenia leptyny, insuliny, parametrów gospodarki lipidowej i antropometrycznych u młodych osób z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym. *Nadciśnienie Tętnicze* 2008; 12: 424–431.
12. Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. Leptin in immunology. *J Immunol* 2005; 174: 3137–3142.
13. Ahima RS, Qi Y, Singhal NS, et al. Brain adipocytokine action and metabolic regulation. *Diabetes* 2006; 55: S145–S154.
14. Ahima RS, Lazar MA. Adipocytokines and the peripheral and neutral control of energy balance. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 1023–1031.
15. Baumann H, Morella KK, White DW. The full length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 8374–8378.
16. Baskin DG, Schwartz MW, Seeley RJ, et al. Leptin receptor long-form splice-variant protein expression in neuron cell bodies of the brain and co-localization with neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus. *J Histochem Cytochem* 1999; 47: 353–362.
17. Lee GH, Proenca R, Montez JM, et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 1996; 379: 632–635.
18. Fei H, Okano HJ, Li C, et al. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 7001–7005.
19. Weinhold B. Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect* 2006; 114: A160–167.
20. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: A landscape takes shape. *Cell* 2007; 128: 635–638.
21. Zhu J-K. Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases. *Annu Rev Genet* 2009; 43: 143–166.
22. Jeltsch A. Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 301: 203–225.
23. Moss TJ, Wallrath LL. Connections between epigenetic gene silencing and human disease. *Mutat Res* 2007; 618: 163–174.
24. Huang L, Li C. Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Res* 2000; 10: 81–92.
25. Kułaga Z, Litwin M, Tkaczyk M, et al. Polish 2010 growth references for school-aged children and adolescents. *Eur J Pediatr* 2011; 170: 599–609.
26. MethPrimer*. Available at: <http://www.urogene.org/methprimer2> (accessed: March 31, 2020).
27. Primer Design and Search Tool. Available at: <http://bisearch.enzim.hu/> (accessed: March 31, 2020).
28. Melzner I, Scott V, Dorsch K, et al. Leptin gene expression in human preadipocytes is switched on by maturation-induced demethylation of distinct CpGs in its proximal promoter. *J Biol Chem* 2002; 277: 45420–45427.

29. Stoger R. In Vivo Methylation Patterns of the Leptin Promoter in Human and Mouse. *Epigenetics* 2006; 1: 155-162.
30. Plagemann A, Harder T. Hormonal programming in perinatal life: leptin and beyond. *Br J Nutr* 2009; 101: 151-152.
31. Krechowec SO, Vickers M, Gertler A, Breier BH. Prenatal influences on leptin sensitivity and susceptibility to diet-induced obesity. *J Endocrinol* 2006; 189: 355-363.
32. Fan CN, Liu XL, Shen WW, et al. The Regulation of Leptin, Leptin Receptor and Pro-opiomelanocortin Expression by N-3 PUFAs in Diet-Induced Obese Mice Is Not Related to the Methylation of Their Promoters. *Nutr Metab (Lond)* 2011; 8: 31.
33. Glendining KA, Higgins MBA, Fisher LC, Jasoni CL. Maternal obesity modulates sexually dimorphic epigenetic regulation and expression of leptin receptor in offspring hippocampus. *Brain Behav Immun* 2020 Mar 12; S0889-1591(19)31512-0. doi: 10.1016/j.bbi.2020.03.006 [Epub ahead of print].
34. Khalyfa A, Carreras A, Hakim F, et al. Effects of late gestational high-fat diet on body weight, metabolic regulation and adipokine expression in offspring. *Int J Obes (Lond)* 2013; 37: 1481-1489.
35. Campion J, Milagro FI, Martínez JA. Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev* 2009; 10: 383-392.

Katarzyna Jakubek-Kipa¹, Sabina Galiniak², Artur Mazur¹

Role of chemerin in the metabolic regulation of type 1 diabetes in children

Rola chemeryny w regulacji metabolicznej cukrzycy typu 1 u dzieci

¹ Department of Paediatrics, Institute of Medical Sciences, Medical College of Rzeszów University, Rzeszów, Poland

² Department of Biochemistry and General Chemistry, Institute of Medical Sciences, Medical College of Rzeszów University, Rzeszów, Poland

Correspondence: Katarzyna Jakubek-Kipa, Department of Paediatrics, Institute of Medical Sciences, Medical College of Rzeszów University, Warszawska 1a, 35-310 Rzeszów, Poland, e-mail: k_jakubek@op.pl

 <https://doi.org/10.15557/PIMR.2024.0030>

ORCID iDs

1. Katarzyna Jakubek-Kipa  <https://orcid.org/0000-0003-2314-6398>

2. Sabina Galiniak  <https://orcid.org/0000-0002-1129-3553>

3. Artur Mazur  <https://orcid.org/0000-0001-5393-3515>

Abstract

Introduction and objective: Type 1 diabetes is one of the most common chronic diseases of childhood, leading to the development of chronic micro- and macrovascular complications. Recently, many researchers have been focusing their efforts on identifying new markers for the progression of this disease. It is known that adipokines play a significant role in the regulation of lipid and carbohydrate metabolism. The aim of this study was to evaluate the level of serum chemerin in children with type 1 diabetes and assess their correlation with body mass index, glycated haemoglobin, and lipid profile. **Materials and methods:** The study group included 40 children with newly diagnosed, 40 with long-term diabetes, and 14 children without diabetes as a control group. Chemerin levels were measured using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** We did not find any statistically differences in chemerin levels in the studied groups of children. In the group of patients with long-term, metabolically well-controlled diabetes, chemerin levels were higher in girls than in boys ($p = 0.028$). Moreover, no difference in chemerin levels was observed between the studied groups of children depending on the body mass index percentiles. A negative correlation was found between chemerin level and age in children with newly diagnosed diabetes and metabolically well-controlled diabetes. **Conclusions:** Our study provides new insights into the status of chemerin among paediatric patients with varying degrees of type 1 diabetes control. However, further research is needed involving larger groups of patients with differing degrees of sexual maturation and with the presence of microvascular complications.

Keywords: diabetes mellitus, body mass index, chemerin

Streszczenie

Wprowadzenie i cel: Cukrzyca typu 1 jest jedną z najczęstszych chorób przewlekłych wieku dziecięcego, prowadzącą do rozwoju przewlekłych powikłań mikro- i makronaczyniowych. Wielu badaczy w ostatnim czasie kieruje swoje wysiłki na poszukiwanie nowych markerów zaawansowania tej choroby. Wiadomo, że adipokiny odgrywają znaczącą rolę w regulacji metabolizmu lipidów i węglowodanów. Celem pracy była ocena poziomu chemeryny w surowicy dzieci chorych na cukrzycę typu 1 i jego korelacji ze wskaźnikiem masy ciała, hemoglobina glikowaną i profilem lipidowym. **Materiał i metody:** Grupę badaną stanowiło 40 dzieci z nowo rozpoznaną, 40 z długotrwałą cukrzycą oraz 14 dzieci zdrowych, które stanowiły grupę kontrolną. Chemerynę oznaczono za pomocą testu immunoenzymatycznego. **Wyniki:** Nie stwierdzono statystycznych różnic w stężeniu chemeryny w badanych grupach dzieci. W grupie pacjentów z długotrwałą cukrzycą, dobrze kontrolowanych metabolicznie stężenie chemeryny było wyższe u dziewcząt niż u chłopców ($p = 0,028$). Ponadto nie zaobserwowano różnic w stężeniu chemeryny pomiędzy badanymi grupami dzieci w zależności od percentyli wskaźnika masy ciała. Odnotowano ujemną korelację pomiędzy poziomem chemeryny a wiekiem u dzieci ze świeżo rozpoznaną cukrzycą i cukrzycą dobrze wyrównaną metabolicznie. **Wnioski:** Niniejsze badanie dostarcza nowych informacji na temat statusu chemeryny wśród pacjentów pediatrycznych z różnym stopniem kontroli cukrzycy typu 1. Konieczne są jednak dalsze badania obejmujące większe grupy pacjentów, różniących się stopniem dojrzałości płciowej i występowaniem powikłań mikronaczyniowych.

Słowa kluczowe: cukrzyca, wskaźnik masy ciała, chemeryna

INTRODUCTION

Diabetes mellitus is a global health problem, affecting populations in both developing and developed countries. Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is the most common form of diabetes in children and adolescents, and also one of the most common chronic diseases of childhood. In 2021, an estimated 108,300 children and adolescents under the age of 15 years were newly diagnosed with T1DM, and 651,700 children and adolescents were living with the condition worldwide⁽¹⁾.

Long-term damage, dysfunction, and failure of various organs, especially eyes, kidneys, nerves, heart, and blood vessels are caused by chronic hyperglycaemia associated with diabetes⁽²⁾. Many recent studies have discussed the role of adipose tissue as an endocrine organ⁽³⁾. Adipokines such as adiponectin, leptin, resistin, chemerin, progranulin, and omentin are bioactive mediators secreted by adipose tissue⁽⁴⁾. They play a significant role in the regulation of lipid and carbohydrate metabolism, insulin sensitivity, and insulin secretion, and are involved in inflammatory responses⁽⁵⁾. The role of adipokines in the pathogenesis of T1DM has also been studied⁽⁶⁾. One of the newly identified adipokines, chemerin, plays a role in the glucose metabolism. Chemerin is expressed predominantly in white adipose tissue, with only small amounts found in brown adipose tissue⁽⁷⁾. It is associated with obesity and may mediate the relationship between increased fat mass and early atherogenic risk in obese children^(8,9). Chemerin influences both inflammation and metabolism, and may provide a link between chronic inflammation, obesity, and its related disorders⁽¹⁰⁾. Furthermore, in T1DM patients, chemerin may be considered a promising adipokine for the development of diabetic complications, including pathological changes in glucolipid metabolism and inflammatory factors, which may promote the development of macroangiopathy, diabetic retinopathy, and nephropathy⁽¹¹⁾. Moreover, many studies have indicated that chemerin may be related to immune-mediated inflammatory disease, high blood pressure, and vascular endothelial function⁽¹²⁾.

AIM OF THE STUDY

The aim of this study was to evaluate the levels of serum chemerin in T1DM children and establish their correlation with body mass index (BMI), glycated haemoglobin (HbA1c), and lipid profile.

MATERIALS AND METHODS

Ethical approval

The study protocol was approved by the Bioethics Committee at the Rzeszów University (Resolution No. 2018/03/08). All activities conducted in studies involving human participants adhered to the ethical principles set

forth by the institutional and/or national research committee, in accordance with the 1964 Declaration of Helsinki and its subsequent revisions, or equivalent ethical guidelines. Written informed consent was obtained from either the legal guardians and/or the study participants themselves.

Study subjects

The study encompassed a total of 94 children, divided into four distinct groups. Among the children with diabetes, there were 40 patients with newly diagnosed T1DM (NT1DM) and 40 with long-term T1DM, defined as lasting more than one year. In the long-term T1DM group, 20 children had good metabolic control (T1DMw), while the other 20 had poor metabolic control (T1DMn). All children were of Caucasian ethnicity, and none had a family history of T1DM or any other forms of diabetes. The diagnosis of T1DM adhered to the criteria established by the International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes⁽¹³⁾. Participants were recruited from the Department of Paediatrics, Paediatric Endocrinology and Diabetology, as well as the Endocrinology Outpatient Clinic, between January 2019 and April 2021. The measurement of chemerin levels was performed on the fifth day of hospitalisation, following the stabilisation of the patients' general condition. For the remaining patients, the duration of diabetes treatment exceeded one year. Patients with T1DM were treated with insulin analogues through either intensive insulin therapy using insulin pens or continuous subcutaneous insulin infusion via a personal insulin pump. Poor metabolic control was defined as an HbA1c level exceeding 7%.

Concurrent with the study, a control group of 14 healthy children was recruited from a local paediatric outpatient department. These healthy children had no medical history of illnesses and were confirmed as healthy during clinical examinations.

Children whose BMI exceeded the 85th percentile for their respective sex and age were included in both the diabetic and healthy children groups. However, having a BMI above the 85th percentile was not a criterion for exclusion from the study groups. Subsequently, the patients were categorised into three groups based on their BMI percentiles: 1) underweight – less than the 3rd percentile, 2) healthy weight – between the 3rd percentile and less than the 85th percentile, and 3) overweight and obesity – at or above the 85th percentile.

It is noteworthy that all children shared similar socioeconomic status, lifestyle, and dietary habits.

Blood collection and analysis

In the morning, following an overnight fasting period, a venous peripheral blood sample of 5 mL was drawn and collected in a standard clotting activator tube. After collection, the samples were allowed to clot and were subsequently

		NT1DM	Long-term T1DM		Healthy controls	p
			T1DMw	T1DMn		
Sex (F/M)		11/29	6/14	10/10	9/5	
Age [years]	Mean $\pm$ SD	9.47 $\pm$ 3.91	11.86 $\pm$ 3.94	13.37 $\pm$ 3.5	14.33 $\pm$ 4.84	0.001
	Range	2.2–16.1	2.9–17.9	5.1–17.8	3.6–17.6	
BMI [kg/m ²]	Mean $\pm$ SD	16.84 $\pm$ 3.67	18.05 $\pm$ 2.69	21.64 $\pm$ 3.54	21.22 $\pm$ 3.05	<0.001
	Range	12.5–26.34	14.31–24.16	16.27–28.06	15.03–26.34	
BMI percentiles						
<3 rd	n (%)	7 (17.5)	0	0	0	
3 rd –85 th	n (%)	27 (67.5)	16 (80)	13 (65)	11 (79)	
>85 th	n (%)	6 (15)	4 (20)	7 (35)	3 (21)	
HbA1c [%]	Mean $\pm$ SD	11.78 $\pm$ 2.58	6.47 $\pm$ 0.48	10.18 $\pm$ 2.18	5.29 $\pm$ 0.19	<0.001
	Range	6.93–17.03	5.23–6.9	8–15.1	4.9–5.6	
TC [mg%]	Mean $\pm$ SD	178.23 $\pm$ 55.66	170.5 $\pm$ 27.95	179 $\pm$ 47.42	176.07 $\pm$ 11.81	0.929
	Range	16–297	129–224	125–292	150–190	
HDL [mg%]	Mean $\pm$ SD	54.38 $\pm$ 30.13	62.65 $\pm$ 17.9	58.45 $\pm$ 9.29	49.93 $\pm$ 7.67	0.007
	Range	19–181	29–97	40–78	40–68	
LDL [mg%]	Mean $\pm$ SD	95.38 $\pm$ 44.1	92.1 $\pm$ 20.96	99 $\pm$ 35.52	82.14 $\pm$ 17.65	0.543
	Range	30–206	45–124	44–182	60–115	
TG [mg%]	Mean $\pm$ SD	297.93 $\pm$ 319.63	62.65 $\pm$ 17.9	112.7 $\pm$ 72.24	99.86 $\pm$ 27.72	<0.001
	Range	53–1800	34–139	41–328	58–156	
BMI – body mass index; HbA1c – glycated haemoglobin A1; TC – total cholesterol; TG – triglycerides; NT1DM – patients with newly diagnosed diabetes; T1DMw – patients with long-term diabetes, metabolically well-controlled; T1DMn – patients with long-term diabetes, metabolically poorly controlled.						

BMI – body mass index; HbA1c – glycated haemoglobin A1; TC – total cholesterol; TG – triglycerides; NT1DM – patients with newly diagnosed diabetes; T1DMw – patients with long-term diabetes, metabolically well-controlled; T1DMn – patients with long-term diabetes, metabolically poorly controlled.

Tab. 1. General characteristics of children included in the study

centrifuged for 10 minutes at 1,000 g, maintaining a temperature of 4°C, using a centrifuge model 5702 R from Eppendorf AG (Germany). The resulting serum was then carefully transferred into cryovials and promptly frozen at –80°C for subsequent analysis. It is important to note that the serum samples were not stored for longer than one month, and they were thawed at room temperature only once during the analysis process. Additional clinical parameters were extracted from the patients' clinical records.

Chemerin assay

Chemerin was estimated with using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (E102, Mediagnost, Germany). According to the manufactures specifications, the inter- and intra-assay coefficients of variation are below 10%. Absorptometric measurements were performed on a Tecan Infinite 200 PRO multimode reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). Serum levels of chemerin were expressed in ng/mL.

Statistical analysis

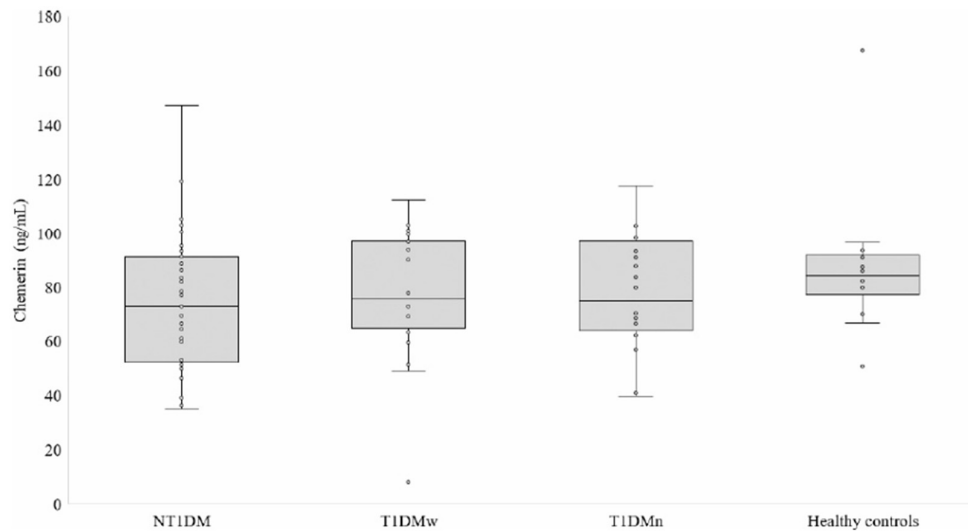
Statistical analyses were conducted using the STATISTICA software package (version 13.3, StatSoft Inc., 2017, Tulsa, OK, USA). The data were presented as the mean and standard deviation (SD), along with the range. It is important to note that the majority of variables did not conform to a normal distribution, as confirmed by the Shapiro–Wilk test, thus necessitating the application of non-parametric

tests. Multiple comparisons were carried out using the Kruskal–Wallis ANOVA. Statistical significance was determined with a *p*-value of less than 0.05.

RESULTS

The study included 40 children with NT1DM, ages ranging from 2.2 to 16.1 years, and 40 patients with long-term T1DM (20 with T1DMw, ages ranging from 2.9 to 17.9 years, and 20 with T1DMn, ages ranging from 5.1 to 17.8 years). The control group consisted of 14 healthy children, ages ranging from 3.6 to 17.6 years (Tab. 1).

Children from the NT1DM group were statistically younger than those from the T1DMn group (*p* = 0.007) and the healthy children (*p* < 0.001). Children with NT1DM had a statistically lower BMI than those from the T1DMn group (*p* < 0.001) and the healthy children (*p* = 0.002). Moreover, children from the NT1DM group had a statistically higher level of HbA1c compared to those from the T1DMw group (*p* < 0.001) and the healthy children (*p* < 0.001). Children with long-term and well-controlled diabetes had statistically lower HbA1c levels than those from T1DMn group (*p* < 0.001). There was no statistical difference in cholesterol and LDL levels. We noted a statistical difference in the level of HDL between children from the NT1DM group and those from the T1DMw group (*p* = 0.036). Finally, children from the NT1DM group had statistically higher levels of triglycerides than those from the T1DMw group (*p* < 0.001), the T1DMn group (*p* = 0.002), and the healthy children (*p* = 0.02).



NT1DM – patients with newly diagnosed diabetes; **T1DMw** – patients with long-term diabetes, metabolically well-controlled; **T1DMn** – patients with long-term diabetes, metabolically poorly controlled.

Fig. 1. Chemerin levels in studied groups

		Chemerin [ng/mL]
NT1DM	Boys	73.03 ± 21.2
	Girls	73.32 ± 33.64
	p	0.628
T1DMw	Boys	69.71 ± 24.83
	Girls	93.88 ± 11.24
	p	0.028
T1DMn	Boys	78.93 ± 23.33
	Girls	77 ± 19.93
	p	0.791
HC	Boys	86.85 ± 5.68
	Girls	87.11 ± 32.95
	p	0.351

NT1DM – patients with newly diagnosed diabetes; **T1DMw** – patients with long-term diabetes, metabolically well-controlled; **T1DMn** – patients with long-term diabetes, metabolically poorly controlled; **HC** – healthy controls.

Tab. 2. Chemerin parameters depending on the sex of the study participants

Fig. 1 presents the levels of chemerin in studied groups. No statistically differences were found in the level of chemerin among the studied groups of children (NT1DM: 73.11 ± 24.84 ng/mL, T1DMw: 76.96 ± 24.17 ng/mL, T1DMn: 77.97 ± 21.14 ng/mL, and healthy children: 87.02 ± 26.04 ng/mL, $p = 0.357$).

Tab. 2 presents differences in chemerin levels depending on the sex of the study participants.

There was no statistical difference in chemerin levels among children with NT1DM, T1DMn and the healthy children. In the T1DMw group, chemerin levels were higher in girls than in boys ($p = 0.028$).

Tab. 3 presents the level of chemerin depending on BMI percentiles. Children below the 3rd percentile were present only in the NT1DM group. No difference in chemerin levels was observed between the studied groups of children.

The dependence between chemerin levels and the general characteristics of patients was estimated using Spearman correlation. Spearman's rank correlation coefficients and p values for each separate studied group are presented in Tab. 4. We found a negative correlation between chemerin levels and age in children with NT1DM and T1DMw ($R = -0.344$, $p = 0.029$ and $R = -0.66$, $p = 0.002$, respectively). Moreover, in the group of healthy children, there was a moderate positive correlation between the level of chemerin and Hb1Ac. A strong negative correlation was also found between chemerin levels and LDL in healthy controls. No other associations were demonstrated between chemerin concentration and the other analysed parameters.

DISCUSSION

Scientific research in recent years among children with T1DM suggests a possible role of chemerin in the development of diabetes and diabetic complications. In our study, no statistically significant differences in the concentration of chemerin were found among the studied group of children (NT1DM: 73.11 ± 24.84 ng/mL, T1DMw: 76.96 ± 24.17 ng/mL, T1DMn: 77.97 ± 21.14 ng/mL and healthy children: 87.02 ± 26.04 ng/mL, $p > 0.05$). No difference in chemerin levels between recent-onset and long-term diabetic subjects was also observed in a study by Verrijn Stuart et al.

BMI	NT1DM	T1DMw	T1DMn	HC	<i>p</i>	<i>p</i> ^{T1DMw/HC}	<i>p</i> ^{T1DMn/HC}	<i>p</i> ^{NT1DM/T1DMw}	<i>p</i> ^{NT1DM/T1DMn}	<i>p</i> ^{T1DMw/T1DMn}
<3 rd	67 ± 23.07	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 rd –85 th	74.94 ± 24.47	77.99 ± 19.23	79.38 ± 20.81	87.45 ± 29.37	0.657	>0.999	>0.999	>0.999	>0.999	>0.999
>85 th	71.78 ± 32.9	73.86 ± 38.27	75.34 ± 23.16	85.43 ± 9.49	0.887	>0.999	>0.999	>0.999	>0.999	>0.999

BMI – body mass index; NT1DM – patients with newly diagnosed diabetes; T1DMw – patients with long-term diabetes, metabolically well-controlled; T1DMn – patients with long-term diabetes, metabolically poorly controlled; HC – healthy controls.

Tab. 3. Chemerin levels depending on BMI percentile

	NT1DM		T1DMw		T1DMn		HC	
	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>p</i>
Age	–0.344	0.029	–0.660	0.002	–0.156	0.513	–0.205	0.481
BMI	–0.088	0.586	–0.332	0.152	0.089	0.710	0.064	0.829
HbA1c	–0.189	0.241	0.222	0.346	–0.056	0.815	0.582	0.029
TC	–0.164	0.311	0.179	0.450	–0.266	0.257	–0.223	0.444
HDL	0.053	0.745	0.061	0.799	–0.390	0.089	0.360	0.206
LDL	–0.189	0.244	0.259	0.270	0.421	0.065	–0.601	0.023
TG	–0.092	0.57	–0.319	0.170	–0.143	0.547	–0.106	0.719

BMI – body mass index; HbA1c – glycated haemoglobin A1; TC – cholesterol; TG – triglycerides; NT1DM – patients with newly diagnosed diabetes; T1DMw – patients with long-term diabetes, metabolically well-controlled; T1DMn – patients with long-term diabetes, metabolically poorly controlled; HC – healthy controls.

Tab. 4. Spearman's rank correlation coefficients and *p* values for chemerin

(220 vs. 255 ng/mL, $p > 0.05$)⁽¹⁴⁾. Similarly, among children with TDM1 and normal body weight, chemerin levels did not differ depending on the duration of diabetes⁽¹⁵⁾. This may indicate that the duration of TDM1 may not affect chemerin levels in children. On the other hand, adult patients with increased levels of chemerin had a longer duration of diabetes in a study by Gu et al.⁽¹⁶⁾. Similar observations were made among Egyptian diabetic adults in a study by Elmahdy et al.⁽¹⁷⁾.

Importantly, no difference in chemerin levels was observed between children with good and poor diabetic control. Likewise, no relationship between chemerin levels and metabolic control of the disease was observed in normal weight children with TDM1⁽¹⁵⁾.

In contrast, Elsehawawy et al. found a significant increase in serum chemerin in children with T1DM as compared to controls (117.12 ± 25.79 vs. 83.33 ± 5.51 pg/mL, $p < 0.001$) as well as in non-controlled and controlled diabetic children (135.36 ± 15.18 vs. 89.67 ± 4.85 pg/mL, $p < 0.001$)⁽¹¹⁾. Chemerin was significantly higher in adolescent diabetic patients than in healthy controls⁽¹⁸⁾. Increased circulating chemerin was also observed in adult patients with type 2 diabetes mellitus^(16,19). Abnormal levels of circulating and gluteal subcutaneous adipose tissue-secreted chemerin were noted in adult patients with nascent metabolic syndrome⁽²⁰⁾.

Also, no statistical difference in chemerin levels was found depending on sex among children with NT1DM, T1DMn, and healthy children. In the T1DMw group, chemerin levels were higher in girls than in boys ($p < 0.05$). The associations between chemerin concentration and the sex of the subjects are not clearly defined – some studies indicate no

sex differences, whereas others describe increased concentration of this hormone in one of the sexes^(17–24).

Furthermore, no difference in chemerin levels was observed between the studied groups of children depending on BMI percentiles. In contrast, the study by Redondo et al. found that obese children had significantly higher serum chemerin levels compared with lean children (125.1 vs. 98.4 ng/mL, $p = 0.001$)⁽²⁵⁾. Moreover, in the group with obesity, the serum levels of chemerin were significantly higher compared with the controls (130.5 vs. 113.8 ng/mL, $p = 0.006$)⁽²⁶⁾. Similar observations have been described in other reports^(9,27).

Our study showed no correlation between chemerin levels and patients' clinical parameters including HbA1c and lipid profiles. Only negative correlations were found between chemerin and age in children with NT1DM and T1DMw. A positive association of chemerin with age was observed in majority of studies on chemerin levels in adult humans^(23,28). A positive correlation of chemerin with BMI, urea, fasting blood glucose, and HbA1c was noted among diabetic children in a recent study⁽¹¹⁾. Moreover, the results of other authors showed a relationship between chemerin and LDL levels⁽¹⁸⁾. In obese children without metabolic syndrome components, chemerin levels also positively correlated with BMI z-score ($R = 0.33$, $p < 0.01$) and the inflammatory parameter C-reactive protein ($R = 0.36$, $p < 0.01$)⁽²⁶⁾. Furthermore, positive correlations were found between chemerin levels and BMI for age in both lean and obese children^(9,27).

CONCLUSION AND LIMITATIONS

Although our study provides new information on chemerin among paediatric patients with varying degrees of T1DM

213

control, several limitations of the study should be mentioned. The study is a single-centre study with a small group of children. The COVID-19 pandemic prevented us from collecting a larger group of patients. Moreover, the assessment of chemerin levels in children with long-term diabetes and the presence of nephropathy and diabetic retinopathy seems to be an interesting issue. Therefore, further research is needed involving larger groups of patients differing in the degree of sexual maturation and the presence of microvascular complications.

Conflict of interest

The authors do not report any financial or personal connections with other persons or organisations that could adversely affect the publication's content and claim the right to this publication.

Author contribution

Original concept of study: KJK, AM. Collection, recording and/or compilation of data: KJK. Analysis and interpretation of data; writing of manuscript: KJK, SG. Critical review of manuscript; final approval of manuscript: AM.

References

- Libman I, Haynes A, Lyons S et al.: ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2022: definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes* 2022; 23: 1160–1174.
- American Diabetes Association: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2014; 37 Suppl 1: S81–S90.
- Kozakowski J, Dudek P, Zgliczyński W: Obesity-diabetes-endocrinopathy – the metabolic connection. *Eur J Clin Exp Med* 2022; 20: 459–469.
- Ouchi N, Parker J, Lugus J et al.: Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 85–97.
- Ruchat SM, Loos RJF, Rankinen T et al.: Associations between glucose tolerance, insulin sensitivity and insulin secretion phenotypes and polymorphisms in adiponectin and adiponectin receptor genes in the Quebec Family Study. *Diabet Med* 2008; 25: 400–406.
- Ismail MM, Abdel Hamid TA, Ibrahim AA et al.: Serum adipokines and vitamin D levels in patients with type 1 diabetes mellitus. *Arch Med Sci* 2017; 13: 738–744.
- Zdanowicz K, Bobrus-Chociej A, Lebensztejn DM: Chemerin as potential biomarker in pediatric diseases: a PRISMA-compliant study. *Biomedicines* 2022; 10: 591.
- Aydın K, Canpolat U, Akın Ş et al.: Chemerin is not associated with subclinical atherosclerosis markers in prediabetes and diabetes. *Anatol J Cardiol* 2016; 16: 749–755.
- Landgraf K, Friebe D, Ullrich T et al.: Chemerin as a mediator between obesity and vascular inflammation in children. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: E556–E564.
- Roman AA, Parlee SD, Sinal CJ: Chemerin: a potential endocrine link between obesity and type 2 diabetes. *Endocrine* 2012; 42: 243–251.
- Elsahmawy AAEW, El-Toukhy SE, Seliem NMA et al.: Apelin and chemerin as promising adipokines in children with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2019; 12: 383–389.
- Yang M, Zhou X, Xu J et al.: Association of serum chemerin and inflammatory factors with type 2 diabetes macroangiopathy and waist-to-stature ratio. *Bosn J Basic Med Sci* 2019; 19: 328–335.
- International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes: Available from: <https://www.ispad.org/> [cited: 21 March 2023].
- Verrijn Stuart AA, Schipper HS, Tasdelen I et al.: Altered plasma adipokine levels and *in vitro* adipocyte differentiation in pediatric type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 463–472.
- Zubkiewicz-Kucharska A, Chrzanowska J, Seifert M et al.: [Chemerin concentration in children with type 1 diabetes]. *Pediatr Endocrinol* 2017; 16: 87–94.
- Gu P, Wang W, Yao Y et al.: Increased circulating chemerin in relation to chronic microvascular complications in patients with type 2 diabetes. *Int J Endocrinol* 2019; 2019: 8693516.
- Elmahdy AG, Ibrahim MMA, Salama OH et al.: Association of the serum chemerin level with the development of diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes mellitus. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol* 2023; 11: 171–178.
- El Dayem SMA, Battah AA, El Bohy Ael M et al.: Relationship of plasma level of chemerin and vaspin to early atherosclerotic changes and cardiac autonomic neuropathy in adolescent type 1 diabetic patients. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2015; 28: 265–273.
- Khaled Y, Rashed L: Serum chemerin levels and chemerin rs17173608 genotypes in the susceptibility of diabetic nephropathy in Egyptian diabetic patients. *Egyptian Journal of Obesity, Diabetes and Endocrinology* 2016; 2: 18.
- Jialal I, Devaraj S, Kaur H et al.: Increased chemerin and decreased omentin-1 in both adipose tissue and plasma in nascent metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: E514–E517.
- Chakaroun R, Raschpichler M, Klötting N et al.: Effects of weight loss and exercise on chemerin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Metabolism* 2012; 61: 706–714.
- Yang M, Yang G, Dong J et al.: Elevated plasma levels of chemerin in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus with hypertension. *J Invest Med* 2010; 58: 883–886.
- Zylla S, Pietzner M, Kühn JP et al.: Serum chemerin is associated with inflammatory and metabolic parameters—results of a population-based study. *Obesity (Silver Spring)* 2017; 25: 468–475.
- Takahashi M, Inomata S, Okimura Y et al.: Decreased serum chemerin levels in male Japanese patients with type 2 diabetes: sex dimorphism. *Endocr J* 2013; 60: 37–44.
- Redondo MJ, Rodriguez LM, Haymond MW et al.: Serum adiposity-induced biomarkers in obese and lean children with recently diagnosed autoimmune type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2014; 15: 543–549.
- Rowicka G, Dylag H, Chelchowska M et al.: Serum calprotectin and chemerin concentrations as markers of low-grade inflammation in prepubertal children with obesity. *Int J Environ Res Public Health* 2020; 17: 7575.
- Schipper HS, Nuboer R, Prop S et al.: Systemic inflammation in childhood obesity: circulating inflammatory mediators and activated CD14⁺ monocytes. *Diabetologia* 2012; 55: 2800–2810.
- Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J et al.: Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology* 2007; 148: 4687–4694.

Rozdział VII. - Wyniki.

Publikacja 1 i 3

Ocena parametrów klinicznych i biochemicznych

Dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą były statycznie młodsze niż dzieci z pozostałych grup badanych. Nie stwierdzono statystycznych różnic między średnim wiekiem dziewcząt i chłopców w badanej grupie. Dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą miały statystycznie niższą masę ciała oraz niższe BMI w porównaniu do dzieci z cukrzycą długotrwałą źle wyrównaną i dzieci z grupy kontrolnej. U dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą stwierdzono statystycznie wyższy poziom HbA1c oraz wyższy poziom trójglicerydów w porównaniu do innych grup badanych. Pacjenci z długotrwałą i dobrze kontrolowaną cukrzycą mieli statystycznie niższy poziom HbA1c w porównaniu z pacjentami z cukrzycą długotrwałą źle wyrównaną. Zaobserwowano statystyczną różnicę w poziomie cholesterolu frakcji lipoprotein o dużej gęstości (HDL) między dziećmi z grupy ze świeżo rozpoznaną cukrzycą a długotrwałą dobrze wyrównaną – w pierwszej grupie poziomy cholesterolu HDL były wyższe. Nie obserwowano różnic statystycznych między poziomem cholesterolu całkowitego i cholesterolu frakcji lipoprotein o małej gęstości (LDL) między badanymi grupami.

Publikacja 1

Ocena poziomu leptyny

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono niższe stężenie leptyny u dzieci z cukrzycą niż u dzieci zdrowych. Pacjenci z grupy z nowo rozpoznaną cukrzycą mieli statystycznie wyższy poziom leptyny w porównaniu z pacjentami z długotrwałą cukrzycą źle wyrównaną, ale niższy od pacjentów z grupy kontrolnej. Dzieci z cukrzycą dobrze wyrównaną metabolicznie miały statystycznie niższe stężenie tego hormonu niż dzieci zdrowe. Stwierdzono silną dodatnią korelację między poziomem leptyny a masą ciała i BMI w grupie dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą. Zaobserwowano umiarkowaną dodatnią korelację między poziomem leptyny a poziomem cholesterolu całkowitego i frakcji LDL w grupie dzieci z długotrwałą cukrzycą źle wyrównaną.

Ocena poziomu bioleptyny

Poziom bioleptyny był statystycznie wyższy w grupie dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą w porównaniu do dzieci z cukrzycą długotrwałą źle wyrównaną, ale niższy niż u dzieci zdrowych. W grupie pacjentów ze świeżo rozpoznaną cukrzycą poziom bioleptyny był istotnie wyższy u dzieci z prawidłową masą ciała, nadwagą i otyłością niż w grupie dzieci z niedowagą. Stwierdzono silną dodatnią korelację między poziomem bioleptyny a masą ciała i BMI w grupie dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą. Poziom bioleptyny był dodatnio skorelowany z poziomem cholesterolu HDL

a ujemnie z poziomem cholesterolu LDL w grupie dzieci zdrowych. W grupie dzieci z długotrwałą cukrzycą zaobserwowano wyższe stężenie bioleptyny u chłopców niż u dziewcząt. Pacjenci z cukrzycą świeżo rozpoznaną w porównaniu z chorującymi długotrwale źle wyrównanymi mieli niższe poziomy leptyny, ale wyższe poziomy bioleptyny.

Publikacja 2

Ocena obecności metylacji

Przeanalizowano próbki krwi pobrane od 50 dzieci z otyłością. W badanym materiale nie stwierdzono różnic w metylacji w dwóch badanych wyspach CpG w regionie promotora genu receptora leptyny.

Publikacja 3

Ocena poziomu chemeryny

W analizowanym materiale nie obserwowano różnic statystycznych w poziomie chemeryny w badanych grupach dzieci. W grupie dzieci z cukrzycą długotrwałą źle wyrównaną poziom chemeryny był wyższy u dziewcząt niż u chłopców. Nie stwierdzono różnic w poziomie chemeryny w zależności od percentyla BMI. Zaobserwowano ujemną korelację między stężeniem chemeryny a wiekiem w grupie dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą i długotrwałą dobrze wyrównaną. Nie stwierdzono korelacji między stężeniem chemeryny a stężeniem HbA1c, cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL, HDL i trójglicerydów w badanych grupach pacjentów.

Rozdział VIII. - Dyskusja.

Cukrzyca typu 1 jest przewlekłą chorobą autoimmunologiczną, charakteryzującą się destrukcją komórek β trzustki produkujących insulinę, co prowadzi do bezwzględnego niedoboru tego hormonu. Choroba ta najczęściej diagnozowana jest u dzieci i młodzieży, a jej patogenezą jest złożona i wieloczynnikowa (45). W ostatnich latach coraz większą uwagę poświęca się roli adipokin – hormonów wydzielanych przez tkankę tłuszczową – w rozwoju i progresji DM1. Należą do nich między innymi leptyna i chemeryna, które odgrywają kluczowe role w regulacji metabolizmu, odpowiedzi immunologicznej oraz stanów zapalnych (6,46). Leptyna, znana głównie ze swojej roli w regulacji apetytu i masy ciała, ma również znaczenie w modulacji odpowiedzi immunologicznej. Badania wykazują, że leptyna może wpływać na funkcje limfocytów T oraz makrofagów, co może być istotne w kontekście autoimmunologicznych mechanizmów destrukcji komórek β . Obecność receptorów leptyny w komórkach β trzustki wskazuje na udział leptyny w regulacji wydzielania insuliny (47). Bioleptyna, będąca bardziej biologicznie aktywną formą leptyny, może mieć jeszcze silniejszy wpływ na te procesy. Chemeryna, adipokina zaangażowana w regulację zapalnych i metabolicznych procesów, również wykazuje potencjał modulowania odpowiedzi immunologicznej, co czyni ją istotnym kandydatem do badań w kontekście DM1 (48,49). W publikacjach będących składowymi obecnej rozprawy doktorskiej badano stężenie leptyny, jej aktywnej biologicznie cząsteczki – bioleptyny oraz chemeryny u dzieci z DM1 w zależności od różnych wykładników klinicznych i biochemicznych pacjentów. Oceniono również status metylacji promotora genu receptora leptyny u dzieci z otyłością. Przeprowadzone badania mogą przyczynić się do lepszego rozumienia mechanizmów regulujących równowagę energetyczną ustroju oraz gospodarkę węglowodanową.

W wykonanych oznaczeniach stwierdzono niższy poziom leptyny u dzieci z cukrzycą niż u dzieci zdrowych. Ponadto w grupie dzieci z DM1 stwierdzono statystycznie wyższe stężenie leptyny u dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą w porównaniu z dziećmi z grupy o złym wyrównaniu metabolicznym. Uzyskane wyniki można tłumaczyć większym niedoborem insuliny w tej drugiej grupie chorych. Złe wyrównanie metaboliczne u tych dzieci mogło być konsekwencją stosowania nieodpowiedniej, czyli zbyt małej dawki dobowej insuliny. Dzieci z cukrzycą dobrze wyrównaną metabolicznie miały statystycznie niższy poziom tego hormonu niż dzieci zdrowe. Wiele badań wskazuje, iż leczenie insuliną zwiększa stężenie leptyny, co jest zgodne z uzyskanymi wynikami własnymi. W badaniach Kiessa i wsp. stwierdzono znacznie mniejsze stężenie leptyny w surowicy dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą w porównaniu do dzieci zdrowych i w porównaniu do pacjentów już leczonych insuliną. Autorzy sugerują, że wyższe stężenie leptyny u dzieci leczonych może wskazywać, że pacjenci ci są stymulowani przez intensywną terapię insuliną (50). Hanaki i wsp.

wykazali niższe poziomy leptyny u nowo zdiagnozowanych dzieci w porównaniu z dziećmi zdrowymi, a jej poziom wzrastał po rozpoczęciu leczenia insuliną. Wzrost stężenia leptyny był obserwowany już po 24 godzinach od zastosowania insuliny, natomiast między 3. a 5. dniem leczenia stał się porównywalny do poziomu grupy kontrolnej (51). W badaniach Solimana i wsp. poziom leptyny przed wprowadzeniem insulinoterapii był niższy niż 5 dnia po jej zastosowaniu (52). Odwrotne natomiast obserwacje poczynili w swojej pracy McCormick i wsp., w wyżej wymienionym badaniu obejmującym 17 dzieci świeżo zdiagnozowanych nie uzyskano wzrostu poziomu leptyny po zastosowaniu insuliny zarówno w okresie 1–6 dni od włączenia leczenia ani po upływie 3–26 tygodni, nawet gdy wyniki skorygowano o zmiany wartość BMI pacjentów (53). Obecność receptorów leptyny na komórkach β trzustki sugeruje jej udział w układzie hormonalnym tego narządu, w tym w regulacji wydzielania insuliny. Zakłada się, iż insulina zwiększa produkcję leptyny, podczas gdy leptyna hamuje wydzielanie insuliny (54). Represyjny wpływ leptyny na produkcję insuliny jest regulowany zarówno przez autonomiczny układ nerwowy, jak i bezpośredni wpływ na komórki β trzustki. Wyżej wymienione zależności mogą tłumaczyć obniżony poziom leptyny u pacjentów z niedoborem insuliny w przebiegu DM1 (55,56). Leptyna może hamować podstawowe oraz stymulowane glukozą wydzielanie insuliny. Dzieje się to między innymi przez aktywację zależnych od adenozyno-5'-trifosforanu (ATP) kanałów potasowych, co prowadzi do hyperpolaryzacji błony i zahamowania wydzielania insuliny (57,58). Wyniki kolejnych prac badawczych potwierdzają niedobór leptyny u dzieci ze świeżo rozpoznaną cukrzycą. W omawianej grupie dzieci oceniano poziom leptyny oraz stężenie jej rozpuszczalnego receptora (sOB-R), a wyniki porównywano z parametrami kwasicy ketonowej. Stwierdzono niski poziom leptyny oraz podwyższone stężenie sOB-R. Według autorów, zwiększona regulacja sOB-R wydaje się być mechanizmem kompensacyjnym dla wewnątrzkomórkowego niedoboru energii (59). Z drugiej zaś strony wyniki badania przeprowadzonego przez Moralesa i wsp. wykazują wyższe stężenie leptyny u dzieci z cukrzycą w porównaniu do dzieci zdrowych (60). Podobne obserwacje uzyskali Szalecki i wsp., którzy nie tylko zaobserwowali wyższe stężenie leptyny, ale dodatkowo wyższe stężenia sOB-R u dzieci z DM1 w porównaniu do grupy kontrolnej (61). Podsumowując, wyższy poziom leptyny u dzieci z cukrzycą może być związany z działaniem insuliny, która ma bezpośredni wpływ na produkcję leptyny. Wzrost poziomu leptyny może wynikać ze skutecznego leczenia insuliną, zwiększonej ilości tkanki tłuszczowej lub zaburzeń w regulacji hormonalnej. Mechanizmy regulacyjne leptyny mogą być zakłócone, co prowadzi do jej nadprodukcji.

Niniejsze badanie ponadto wykazało istotną korelację pomiędzy stężeniem leptyny a BMI u dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą – wraz ze wzrostem BMI uzyskano wyższe stężenie leptyny, w pozostałych grupach badanych zarówno w grupach dzieci chorujących na cukrzycę, jak i w grupie kontrolnej nie było tej zależności. Jednym z objawów występujących u dzieci z cukrzycą zanim zostanie postawione rozpoznanie choroby jest spadek masy ciała. Z powodu niedoboru insuliny

zmniejszony zostaje transport do komórki substratu dostarczającego energię jakim jest glukoza, w związku z tym organizm poszukuje alternatywnych źródeł energii, takich jak białka i tłuszcze, nasilając uwalnianie kwasów tłuszczowych i ketogenezę. Wyżej wymienione zależności prowadzą w konsekwencji do redukcji tkanki tłuszczowej i spadku masy ciała (62). W badaniach przeprowadzonych przez Redondo i wsp. stwierdzono, iż u otyłych chłopców w wieku dojrzewania z DM1 poziom leptyny koreluje bardziej z procentową zawartością tkanki tłuszczowej ocenionej metodą DEXA niż z BMI. Wyżej wymienioną obserwację autorzy tłumaczą tym, iż do oceny BMI wykorzystywana jest całkowita masa ciała w tym kości, tkanka łączna, tłuszczowa itp. (63). W związku z tym u dzieci z tym samym BMI mogą występować indywidualne różnice w procentowym udziale poszczególnych tkanek składających się na masę ciała. Leptyna wydzielana jest przez adipocyty, co może tłumaczyć, dlaczego jej poziom bardziej koreluje z ilością tkanki tłuszczowej niż z BMI. Można zatem przypuszczać, że dzieci ze świeżo rozpoznaną cukrzycą mają procentowo najmniej tkanki tłuszczowej, a zatem każde zwiększenie jej ilości, które ma wpływ na wartość BMI powoduje wzrost ilości wydzielanej leptyny, co staje się bardziej zauważalne w tej grupie pacjentów w porównaniu do dzieci dłużej chorujących na cukrzycę (63). Związek między poziomem leptyny a BMI u dzieci z DM1 został opisany w literaturze. W badaniach Solimana i wsp. stwierdzono wyższy poziom leptyny u dzieci z wyższym BMI (52). Kiess i wsp. również wykazali dodatnią korelację między poziomem leptyny a BMI (50). Ponadto Kaza i wsp. badając związek adipokin, w tym leptyny, z czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowymi, takimi jak otyłość, profil lipidowy, kontrola cukrzycy, aktywność fizyczna u dzieci z DM1 stwierdzili dodatnią korelację między stężeniem leptyny a wartością BMI (64). W prezentowanych badaniach własnych nie stwierdzono korelacji między poziomem leptyny a stężeniem HbA1c oraz nasileniem zaburzeń gospodarki kwasowo zasadowej, co jest zgodne z wynikami innych badaczy (50,52,59). Brak tych korelacji może wynikać z odmiennych mechanizmów regulujących te wskaźniki, ich niezależności od stanu metabolicznego oraz wpływu innych złożonych czynników, takich jak dieta, stres, czynniki genetyczne czy stan zapalny. Podobnie jak w badaniach Moralesa i wsp. oraz Kiessa i wsp. nie stwierdzono zależności między poziomem leptyny a parametrami gospodarki lipidowej. Zauważono natomiast umiarkowaną dodatnią korelację między poziomem leptyny a poziomem cholesterolu całkowitego i frakcji LDL w grupie dzieci z długotrwałą cukrzycą źle wyrównaną (50,60). Podobne obserwacje przedstawili Kaza i wsp., którzy w swoim badaniu wykazali dodatnią korelację między poziomem leptyny a poziomem cholesterolu frakcji LDL, natomiast nie zaobserwowali takich zależności z innymi parametrami profilu lipidowego (64).

Analizując poziom bioleptyny stwierdzono statystycznie wyższy jej poziom w grupie dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą w porównaniu do dzieci z cukrzycą długotrwałą źle wyrównaną, ale niższy niż u dzieci zdrowych. Poziom bioleptyny u dzieci z cukrzycą długotrwałą dobrze wyrównaną nie różnił się statystycznie od innych grup badanych. Ponadto w grupie dzieci ze świeżo rozpoznaną cukrzycą

poziom bioleptyny był statystycznie istotnie wyższy u dzieci z prawidłową masą ciała, nadwagą i otyłością niż w grupie dzieci z niedowagą. Zaobserwowano silną dodatnią korelację między poziomem bioleptyny a masą ciała i BMI w grupie dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą. W dostępnej literaturze Niklowitz i wsp. wykazali silny związek bioleptyny ze zmianami BMI, a także z grubością fałdu skórniego i stosunkiem talii do wzrostu. Autorzy ocenili, że stężenia bioleptyny nie różniły się między chłopcami a dziewczętami w wieku przedpokwitaniowym. Zdaniem autorów, bioleptyna lepiej niż leptyna odzwierciedla ilość hormonu zdolnego do wywołania efektu biologicznego (65). W prezentowanych wynikach własnych obserwowano natomiast tendencję do wyższych poziomów bioleptyny u chłopców niż u dziewcząt w grupie dzieci z długotrwałą cukrzycą. Ciekawą obserwacją jest to, że w grupie dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą, w porównaniu z grupą dzieci chorujących długotrwale i źle wyrównanych, zaobserwowano niższe poziomy leptyny, ale wyższe poziomy bioleptyny. Co więcej hormon ten był dodatnio skorelowany z LDL i trójglicerydami w grupie dzieci ze źle kontrolowaną cukrzycą. Leptyna zwiększa wrażliwość na insulinę w tkankach obwodowych, takich jak mięśnie i wątroba, co nasila transport glukozy do komórek i jej metabolizm (66). Ponadto redukuje produkcję glukozy w wątrobie poprzez hamowanie glukoneogenezy i działa na poziomie transkrypcji genów kodujących kluczowe enzymy tego procesu. Dodatkowo, poprzez hamowanie apetytu może pośrednio wpływać na poziom glukozy we krwi (67). Bioleptyna, dzięki swoim właściwościom, być może wywiera silniejsze i bardziej trwałe efekty biologiczne. Wyżej wymienione mechanizmy mogą stanowić potencjalne wyjaśnienie, dlaczego poziom aktywnej biologicznie leptyny był wyższy u dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą. Jednakże odpowiedź na pytanie, co sprawia, że u tych dzieci stężenie leptyny zdolnej do połączenia z receptorem jest wyższe niż stężenie konwencjonalnej cząsteczki, wymaga szczegółowych badań molekularnych. Leptyna w DM1 może wspierać metabolizm glukozy i pomagać w utrzymaniu odpowiedniej masy ciała, co wydaje się istotne dla pacjentów zwłaszcza tych, którzy mogą być podatni na przyrost masy ciała z powodu terapii insulinowej. Badania sugerują, że leptyna może mieć potencjalne zastosowanie terapeutyczne w leczeniu DM1. W modelach zwierzęcych podawanie leptyny prowadziło do znaczącego obniżenia poziomu glukozy we krwi oraz zmniejszenia zapotrzebowania na insulinę (68). Ponadto leptyna może mieć niezależne od insuliny działanie odwracające hiperglikemię i kwasicę ketonową. Dodatkowo adipokina ta zmniejsza hiperfagię, co u osób z cukrzycą jest związane z częściowym lub całkowitym niedoborem insuliny (69). Wyżej wymienione zależności powodują zwiększone zainteresowanie tą cytokiną w leczeniu DM1 u ludzi. Jednakże różnice między myszami z DM1 a ludźmi z DM1 mogą wpływać na skuteczność leczenia leptyną. Dlatego dalsze badania w celu oceny tej możliwości są nadal konieczne. Omawiana adipokina wykazuje również działanie ochronne na komórki β trzustki. W przeprowadzonych badaniach *in vitro* wykazano, że leptyna może zmniejszać apoptozę komórek β , co jest istotne dla zachowania resztkowej funkcji trzustki w zakresie wydzielania insuliny. Leptyna odgrywa rolę w modulacji odpowiedzi immunologicznej, wpływając

na proliferację i aktywację limfocytów T (70). Długoterminowe badania nad lipodystrofią u dzieci spowodowały, iż metroleptyna (metionylowany analog ludzkiej leptyny) została zatwierdzona do jej leczenia (71). Co sprawia, że dalsze analizy nad sensem stosowania leptyny w DM1 są potrzebne. Analizując narastający problem otyłości u dzieci, która dotyczy również pacjentów z DM1 warto zwrócić uwagę na nieprawidłową dietę, która jest jednym z prowadzących do niej czynników. Otyłość to złożona choroba metaboliczna, wynikająca z interakcji między czynnikami genetycznymi, środowiskowymi i epigenetycznymi. Jednym z mechanizmów, które mogą wpływać na ekspresję genu leptyny jest metylacja DNA. Jest to proces epigenetyczny, który polega na przyłączaniu grup metylowych do cytozyny w kontekście dinukleotydu CpG, co zwykle prowadzi do wyciszenia ekspresji genów (72). Czynniki środowiskowe, takie jak dieta i styl życia, mogą wpływać na wzorce epigenetyczne. Dieta bogata w tłuszcze i cukry, a także brak aktywności fizycznej, może przyczyniać się do zmian w metylacji genów związanych z metabolizmem (73). Z drugiej strony, niektóre substancje odżywcze, takie jak kwas foliowy czy witaminy z grupy B, mogą modulować procesy metylacji, a tym samym potencjalnie wpływać na regulację masy ciała. Zmiany epigenetyczne wydają się być dziedziczone z pokolenia na pokolenie. Badania pokazują, że potomstwo rodziców z otyłością ma zwiększone ryzyko rozwoju tej choroby, co częściowo może wynikać z przekazanych epigenetycznych wzorców metylacji DNA (74). Wykazano, że metylacja promotorowego regionu genu leptyny może wpływać na jego ekspresję i tym samym na stężenie leptyny w organizmie (32). Okazuje się, że metylacja hamuje a demetylacja aktywuje ekspresję genu leptyny (75). Wykazano również, że poziom metylacji DNA leptyny w tkance tłuszczowej jest skorelowany z BMI, obwodem talii oraz poziomem cholesterolu LDL. Houde i wsp. ocenili, że poziom metylacji DNA leptyny w podskórnej tkance tłuszczowej jest dodatnio skorelowany z BMI i obwodem talii, podczas gdy mierzony w komórkach krwi jest ujemnie skorelowany z BMI (76). Autorzy prac naukowych opublikowanych w ostatnich latach skupiali swoją uwagę na zjawiskach epigenetycznych występujących w zakresie genu leptyny. Interesujące jest, czy metylacja genu receptora leptyny (*LEPR*) może również być czynnikiem sprzyjającym rozwojowi otyłości. Badania na modelach zwierzęcych i ludziach wykazały, że zmiany w metylacji genu *LEPR* mogą być związane z tą chorobą. Na przykład, badanie Guénard i wsp. wykazało, że u osób otyłych występują wyższe poziomy metylacji promotorowej części genu *LEPR* w porównaniu do osób o prawidłowej masie ciała. Wysoka metylacja genu *LEPR* była związana z obniżoną ekspresją receptora i zmniejszoną wrażliwością na leptynę (77). Inni autorzy sugerują, iż metylacja *LEPR* może nie być skutkiem otyłości, a jej przyczyną. W analizie przeprowadzonej przez Patel i wsp., wykonanej na próbkach śliny, ujawniono, że u dzieci pochodzenia afroamerykańskiego z prawidłową masą ciała obserwuje się wyższą metylację genu *LEPR* niż u dzieci z nadwagą i otyłością. Autorzy sugerują, że uzyskane wyniki otwierają nowe możliwości badawcze (78). W jednej z prac będącej częścią obecnej rozprawy doktorskiej oceniono status metylacji genu receptora leptyny u 50 otyłych dzieci. Przeanalizowano

promotor genu *LEPR* w białych krwinkach krwi obwodowej na dwóch wyspach CpG i nie znaleziono dowodów na obecność metylacji. Możliwe jednak, że metylacja w innych wyspach CpG reguluje jego ekspresję, co może prowadzić do dysfunkcji leptyny. Możliwe również, że zmian nie udało się zidentyfikować, ponieważ materiałem badanym była krew, a nie tkanka tłuszczowa, która jest materiałem trudnym do pozyskania szczególnie u dzieci. Brak obecności metylacji być może wynika również z faktu, iż badaniu poddano dzieci a pojawienie się zmian epigenetycznych może wymagać dłuższego czasu stosowanie nieprawidłowej diety. Chociaż badanie to nie wykazało obecności metylacji dalsze badania w tym kierunku wydają się zasadne a zrozumienie mechanizmów metylacji genu *LEPR* oraz czynników wpływających na ten proces może pomóc w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych w leczeniu otyłości.

Chemeryna jest mniej znaną adipokina, której rola w DM1 jest nadal przedmiotem badań. W toku analiz prowadzonych w ostatnich latach sugeruje się możliwą rolę chemeryny w rozwoju cukrzycy i jej powikłań. Na podstawie przeprowadzonych badań autorzy sugerują, że chemeryna może wpływać na rozwój powikłań cukrzycy typu 1, takich jak retinopatia cukrzycowa. Gomaa Elmahdy i wsp. uzyskali wyższe stężenie tej adipokiny u chorych z retinopatią cukrzycową (79). Oceniano również polimorfizm genu chemeryny i jego związek z makroangiopatią u dzieci z DM1. Stwierdzono, iż u dzieci z DM1 u których występuje polimorfizm genu chemeryny poziom cholesterolu i ABI (wskaźnik kostka-ramię) jest wyższy niż u dzieci bez tych polimorfizmów (80). W świetle przeprowadzonych analiz przedstawionych w jednej z publikacji będących częścią tej rozprawy doktorskiej, nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w stężeniu chemeryny w surowicy między badanymi grupami dzieci. Verrijn Stuart i wsp. również nie zauważyli różnicy w jej poziomie u osób ze świeżą i długotrwałą cukrzycą (81). Co ważne, nie zaobserwowano różnic między dziećmi z dobrą i słabą kontrolą metaboliczną choroby. Z drugiej strony, Elsehrawy i wsp. uzyskali wyższe stężenia chemeryny u dzieci z cukrzycą w porównaniu do dzieci zdrowych (82). Wyższy poziom chemeryny obserwowano także u pacjentów dorosłych z cukrzycą typu 2 (83,84). Nie uzyskano statystycznej różnicy w poziomach chemeryny w zależności od płci porównując dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą, źle wyrównaną oraz dzieci zdrowe. Z kolei, w grupie dzieci z cukrzycą długotrwałą źle wyrównaną poziom chemeryny był wyższy u dziewcząt niż u chłopców. Pod tym względem wyniki uzyskane przez innych badaczy są niejednoznaczne (85,86). W wielu doniesieniach autorzy informują o zależności między poziomem chemeryny a BMI. Jednak w przeprowadzonej analizie nie stwierdzono różnic w stężeniu chemeryny w zależności od percentyla BMI. Jednak w badaniu Redondo i wsp. dzieci otyłe miały istotnie wyższy poziom chemeryny w porównaniu do dzieci szczupłych (87). Ponadto nie wykazano korelacji między stężeniem chemeryny a stężeniem HbA1c, cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL, HDL i trójglicerydów, co różni się od wyników innych badaczy. Dodatnią korelację między BMI, poziomem mocznika, glukozy ocenianej na czczo oraz HbA1c wśród dzieci z DM1 zanotowali

Elschmawy i wsp. (82). Co więcej wyniki prac innych autorów ujawniły korelację między poziomem chemeryny a cholesterolem LDL (88). Autorzy niedawnego doniesienia również wykazali dodatnią korelację między poziom chemeryny a BMI i stężeniem białka CRP u dzieci z otyłością (89).

Chociaż obecne badania dostarczają nowych informacji na temat leptyny, bioleptyny i chemeryny wśród pacjentów pediatrycznych z różnym stopniem kontroli cukrzycy oraz metylacji w zakresie *LEPR* wśród dzieci z otyłością należy wspomnieć o kilku ograniczeniach przeprowadzonych badań. Po pierwsze są to badania jednoosobowe na małej grupie pacjentów. Pandemia COVID-19, która pojawiła się w trakcie rekrutacji pacjentów do badania uniemożliwiła zebranie większej grupy dzieci. Ponadto nie analizowano poziomu rozpuszczalnego receptora leptyny u uczestników badania. Ciekawym zagadnieniem wydaje się zatem zbadanie hipotezy, czy u pacjentów z DM1, u których przy obniżonym poziomie leptyny występuje zwiększone stężenie bioleptyny obserwuje się różnice w ilości rozpuszczalnej postaci jej receptora. Leptyna i chemeryna mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie DM1 poprzez modulację odpowiedzi immunologicznej oraz wpływ na metabolizm glukozy. Zrozumienie mechanizmów molekularnych zaangażowanych w ich działanie może prowadzić do opracowania nowych strategii terapeutycznych w leczeniu DM1. Dodatkowo, w związku z doniesieniami z literatury istotne wydaje się zbadanie wpływu tych adipokin na rozwój powikłań makro- i mikronaczyniowych cukrzycy u dzieci. Wyniki metaanalizy obejmującej 24 badania (1017 dzieci z DM1 i 1045 dzieci rozwijających się prawidłowo) ujawniły wyższy o 9% poziom tkanki tłuszczowej u dzieci z cukrzycą (90). Otyłość staje się zatem ogromnym problemem w tej grupie chorych, co wymaga większej uwagi ukierunkowanej na masę ciała zarówno ze strony pacjentów, jak i zespołu terapeutycznego. Ponadto ograniczeniem prezentowanych wyników może być fakt, iż w grupie dzieci z otyłością analizowano poziom metylacji grup CpG w leukocytach krwi obwodowej. W dostępnej literaturze fakt występowania metylacji potwierdzono wówczas, gdy materiałem badanym był tkanka tłuszczowa lub ślina. Dzięki analizom zjawiska metylacji można lepiej zrozumieć indywidualne predyspozycje genetyczne i epigenetyczne do otyłości. Odwracalny charakter modyfikacji epigenetycznych jest obiecujący dla przyszłych strategii terapeutycznych w otyłości. Personalizacja leczenia na podstawie profilu epigenetycznego pacjenta mogłaby poprawić skuteczność interwencji, dobierając odpowiednią dietę, aktywność fizyczną i leczenie farmakologiczne. Obecnie trwają badania nad lekami, które mogą modulować aktywność enzymów odpowiedzialnych za metylację DNA (np. metylotransferaz DNA). Inhibitory tych enzymów mogłyby przywrócić normalny wzorzec metylacji, co w rezultacie daje szansę na poprawę funkcjonowania genów związanych z metabolizmem i może zmniejszyć masę ciała (74). Mimo że analizy procesu metylacji DNA w kontekście otyłości dostarczają obiecujących wyników, istnieją pewne wyzwania. Po pierwsze, mechanizmy epigenetyczne są złożone i nie w pełni zrozumiane, co może utrudniać opracowanie skutecznych terapii. Ponadto, istnieją różnice w indywidualnej w odpowiedzi na interwencje epigenetyczne, sugeruje to konieczność prowadzenia dalszych badań

na większych grupach osób. W przyszłości rozwój technologii, takich jak sekwencjonowanie nowej generacji oraz zaawansowane metody analizy epigenetycznej, pozwoli na lepsze zrozumienie roli metylacji DNA w otyłości. Co więcej możliwym okazać się może opracowanie bardziej precyzyjnych i spersonalizowanych terapii opartych na profilach epigenetycznych pacjentów.

Rozdział IX. - Wnioski.

Na podstawie przeprowadzonych badań oraz analizy statystycznej wysunięto następujące wnioski:

1. Niski poziom leptyny, ale wyższy bioleptyny był charakterystyczny dla pacjentów ze świeżo rozpoznaną DM1.
2. Poziom leptyny i bioleptyny, ale nie chemeryny wzrastał wraz ze zwiększającym się BMI.
3. Otyłość u dzieci nie była związana ze zwiększonym poziomem metylacji w genie receptora leptyny.

Rozdział X. – Literatura.

1. Grabia M, Markiewicz-Żukowska R, Socha K. Prevalence of Metabolic Syndrome in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes Mellitus and Possibilities of Prevention and Treatment: A Systematic Review. *Nutrients* (2021) 13:1782. doi: 10.3390/nu13061782
2. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* (2011) 11:85–97. doi: 10.1038/nri2921
3. Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, Kim S-Y, Hamnvik O-PR, Koniaris A. Leptin in human physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2011) 301:E567-584. doi: 10.1152/ajpendo.00315.2011
4. Hickey MS, Israel RG, Gardiner SN, Considine RV, McCammon MR, Tyndall GL, Houmard JA, Marks RH, Caro JF. Gender differences in serum leptin levels in humans. *Biochem Mol Med* (1996) 59:1–6. doi: 10.1006/bmme.1996.0056
5. Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* (2006) 393:7–20. doi: 10.1042/BJ20051578
6. Obradovic M, Sudar-Milovanovic E, Soskic S, Essack M, Arya S, Stewart AJ, Gojobori T, Isenovic ER. Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. *Front Endocrinol* (2021) 12:585887. doi: 10.3389/fendo.2021.585887
7. de Candia P, Prattichizzo F, Garavelli S, Alviggi C, La Cava A, Matarese G. The pleiotropic roles of leptin in metabolism, immunity, and cancer. *J Exp Med* (2021) 218:e20191593. doi: 10.1084/jem.20191593
8. Lee M-J, Wang Y, Ricci MR, Sullivan S, Russell CD, Fried SK. Acute and chronic regulation of leptin synthesis, storage, and secretion by insulin and dexamethasone in human adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2007) 292:E858-864. doi: 10.1152/ajpendo.00439.2006
9. Dhar M, Zhu M, Impey S, Lambert TJ, Bland T, Karatsoreos IN, Nakazawa T, Appleyard SM, Wayman GA. Leptin induces hippocampal synaptogenesis via CREB-regulated microRNA-132 suppression of p250GAP. *Mol Endocrinol* (2014) 28:1073–1087. doi: 10.1210/me.2013-1332
10. Jiang W, Zou W, Hu M, Tian Q, Xiao F, Li M, Zhang P, Chen Y-J, Jiang J-M. Hydrogen sulphide attenuates neuronal apoptosis of substantia nigra by re-establishing autophagic flux via promoting leptin signalling in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2022) 49:122–133. doi: 10.1111/1440-1681.13587
11. Cheng Y, Buchan M, Vitanova K, Aitken L, Gunn-Moore FJ, Ramsay RR, Doherty G. Neuroprotective actions of leptin facilitated through balancing mitochondrial morphology and improving mitochondrial function. *J Neurochem* (2020) 155:191–206. doi: 10.1111/jnc.15003
12. Choi W, Kim J-W, Kang H-J, Kim HK, Kang H-C, Lee J-Y, Kim S-W, Stewart R, Kim J-M. Interactive Effects of Serum Leptin Levels and Physical Comorbidity on the Pharmacotherapeutic Response of Depressive Disorders. *Clin Psychopharmacol Neurosci* (2022) 20:662–674. doi: 10.9758/cpn.2022.20.4.662
13. Elias CF. Leptin action in pubertal development: recent advances and unanswered questions. *Trends Endocrinol Metab* (2012) 23:9–15. doi: 10.1016/j.tem.2011.09.002

14. Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Maymó J, Dueñas JL, Varone C, Sánchez-Margalet V. Role of leptin in female reproduction. *Clin Chem Lab Med* (2015) 53:15–28. doi: 10.1515/ccm-2014-0387
15. Blüher S, Mantzoros CS. The role of leptin in regulating neuroendocrine function in humans. *J Nutr* (2004) 134:2469S–2474S. doi: 10.1093/jn/134.9.2469S
16. Oberlin D, Buettner C. How does leptin restore euglycemia in insulin-deficient diabetes? *J Clin Invest* (2017) 127:450–453. doi: 10.1172/JCI91880
17. Bonamichi BDSF, Lee J. Unusual Suspects in the Development of Obesity-Induced Inflammation and Insulin Resistance: NK cells, iNKT cells, and ILCs. *Diabetes Metab J* (2017) 41:229–250. doi: 10.4093/dmj.2017.41.4.229
18. Poetsch MS, Strano A, Guan K. Role of Leptin in Cardiovascular Diseases. *Front Endocrinol* (2020) 11:354. doi: 10.3389/fendo.2020.00354
19. Casado ME, Collado-Pérez R, Frago LM, Barrios V. Recent Advances in the Knowledge of the Mechanisms of Leptin Physiology and Actions in Neurological and Metabolic Pathologies. *Int J Mol Sci* (2023) 24:1422. doi: 10.3390/ijms24021422
20. Caruso A, Gelsomino L, Panza S, Accattatis FM, Naimo GD, Barone I, Giordano C, Catalano S, Andò S. Leptin: A Heavyweight Player in Obesity-Related Cancers. *Biomolecules* (2023) 13:1084. doi: 10.3390/biom13071084
21. Cieżki S, Kurpiewska E, Bossowski A, Głowińska-Olszewska B. Multi-Faceted Influence of Obesity on Type 1 Diabetes in Children - From Disease Pathogenesis to Complications. *Front Endocrinol* (2022) 13:890833. doi: 10.3389/fendo.2022.890833
22. Grahame Hardie D. AMP-activated protein kinase: a key regulator of energy balance with many roles in human disease. *J Intern Med* (2014) 276:543–559. doi: 10.1111/joim.12268
23. Zhang Y, Jin W, Zhang D, Lin C, He H, Xie F, Gan L, Fu W, Wu L, Wu Y. TNF- α Antagonizes the Effect of Leptin on Insulin Secretion through FOXO1-Dependent Transcriptional Suppression of LepRb in INS-1 Cells. *Oxid Med Cell Longev* (2022) 2022:9142798. doi: 10.1155/2022/9142798
24. Zhao Y, Li H. Association of serum leptin and insulin levels among type 2 diabetes mellitus patients: A case-control study. *Medicine (Baltimore)* (2022) 101:e31006. doi: 10.1097/MD.00000000000031006
25. Wabitsch M, Funcke J-B, von Schnurbein J, Denzer F, Lahr G, Mazen I, El-Gammal M, Denzer C, Moss A, Debatin K-M, et al. Severe Early-Onset Obesity Due to Bioinactive Leptin Caused by a p.N103K Mutation in the Leptin Gene. *J Clin Endocrinol Metab* (2015) 100:3227–3230. doi: 10.1210/jc.2015-2263
26. Myers MG, Heymsfield SB, Haft C, Kahn BB, Laughlin M, Leibel RL, Tschöp MH, Yanovski JA. Challenges and opportunities of defining clinical leptin resistance. *Cell Metab* (2012) 15:150–156. doi: 10.1016/j.cmet.2012.01.002
27. Farooqi IS, O’Rahilly S. 20 years of leptin: human disorders of leptin action. *J Endocrinol* (2014) 223:T63–70. doi: 10.1530/JOE-14-0480
28. Wabitsch M, Funcke J-B, Lennerz B, Kuhnle-Krahl U, Lahr G, Debatin K-M, Vatter P, Gierschik P, Moepps B, Fischer-Posovszky P. Biologically inactive leptin and early-onset extreme obesity. *N Engl J Med* (2015) 372:48–54. doi: 10.1056/NEJMoa1406653

29. Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* (1997) 389:374–377. doi: 10.1038/38717
30. Vilariño-García T, Polonio-González ML, Pérez-Pérez A, Ribalta J, Arrieta F, Aguilar M, Obaya JC, Gimeno-Orna JA, Iglesias P, Navarro J, et al. Role of Leptin in Obesity, Cardiovascular Disease, and Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci* (2024) 25:2338. doi: 10.3390/ijms25042338
31. Oral EA. Leptin for type 1 diabetes: coming onto stage to be (or not?). *Pediatr Diabetes* (2012) 13:68–73. doi: 10.1111/j.1399-5448.2011.00797.x
32. Jeltsch A. Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol* (2006) 301:203–225. doi: 10.1007/3-540-31390-7_7
33. Campión J, Milagro FI, Martínez JA. Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev* (2009) 10:383–392. doi: 10.1111/j.1467-789X.2009.00595.x
34. Milagro FI, Campión J, García-Díaz DF, Goyenechea E, Paternain L, Martínez JA. High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem* (2009) 65:1–9. doi: 10.1007/BF03165964
35. Mansell T, Ponsonby A-L, Collier F, Burgner D, Pezic A, Vuillermine P, Ryan J, Saffery R, Barwon Infant Study Investigator Team. Methylation of the LEP gene promoter in blood at 12 months and BMI at 4 years of age—a population-based cohort study. *Int J Obes (Lond)* (2020) 44:842–847. doi: 10.1038/s41366-020-0553-3
36. Nagpal S, Patel S, Jacobe H, DiSepio D, Ghosn C, Malhotra M, Teng M, Duvic M, Chandraratna RA. Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin. *J Invest Dermatol* (1997) 109:91–95. doi: 10.1111/1523-1747.ep12276660
37. Wittamer V, Franssen J-D, Vulcano M, Mirjolet J-F, Le Poul E, Migeotte I, Brézillon S, Tyldesley R, Blanpain C, Detheux M, et al. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J Exp Med* (2003) 198:977–985. doi: 10.1084/jem.20030382
38. Neves KB, Nguyen Dinh Cat A, Lopes RAM, Rios FJ, Anagnostopoulou A, Lobato NS, de Oliveira AM, Tostes RC, Montezano AC, Touyz RM. Chemerin Regulates Crosstalk Between Adipocytes and Vascular Cells Through Nox. *Hypertension* (2015) 66:657–666. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05616
39. Fischer TF, Beck-Sickinger AG. Chemerin - exploring a versatile adipokine. *Biol Chem* (2022) 403:625–642. doi: 10.1515/hsz-2021-0409
40. Zhao L, Zhou J, Abbasi F, Fathzadeh M, Knowles JW, Leung LLK, Morser J. Chemerin in Participants with or without Insulin Resistance and Diabetes. *Biomedicines* (2024) 12:924. doi: 10.3390/biomedicines12040924
41. Macvanin MT, Rizzo M, Radovanovic J, Sonmez A, Paneni F, Isenovic ER. Role of Chemerin in Cardiovascular Diseases. *Biomedicines* (2022) 10:2970. doi: 10.3390/biomedicines10112970
42. Tan L, Lu X, Danser AHJ, Verdonk K. The Role of Chemerin in Metabolic and Cardiovascular Disease: A Literature Review of Its Physiology and Pathology from a Nutritional Perspective. *Nutrients* (2023) 15:2878. doi: 10.3390/nu15132878

43. Bozaoglu K, Segal D, Shields KA, Cummings N, Curran JE, Comuzzie AG, Mahaney MC, Rainwater DL, VandeBerg JL, MacCluer JW, et al. Chemerin is associated with metabolic syndrome phenotypes in a Mexican-American population. *J Clin Endocrinol Metab* (2009) 94:3085–3088. doi: 10.1210/jc.2008-1833
44. Kułaga Z, Rózdżyńska-Świątkowska A, Grajda A, Gurzkowska B, Wojtyło M, Gózdź M, Świąder-Leśniak A, Litwin M. Siatki centylowe dla oceny wzrastania i stanu odżywienia polskich dzieci i młodzieży od urodzenia do 18 roku życia (2015). <https://www.standardy.pl/artykuly/id/804>.
45. Libman I, Haynes A, Lyons S, Pradeep P, Rwagasor E, Tung JY-L, Jefferies CA, Oram RA, Dabelea D, Craig ME. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2022: Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes* (2022) 23:1160–1174. doi: 10.1111/pedi.13454
46. Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, Muruganandan S, Sinal CJ. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J Biol Chem* (2007) 282:28175–28188. doi: 10.1074/jbc.M700793200
47. Marroquí L, Gonzalez A, Neco P, Caballero-Garrido E, Vieira E, Ripoll C, Nadal A, Quesada I. Role of leptin in the pancreatic β -cell: effects and signaling pathways. *J Mol Endocrinol* (2012) 49:R9-17. doi: 10.1530/JME-12-0025
48. Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. Leptin in immunology. *J Immunol* (2005) 174:3137–3142. doi: 10.4049/jimmunol.174.6.3137
49. Helfer G, Wu Q-F. Chemerin: a multifaceted adipokine involved in metabolic disorders. *J Endocrinol* (2018) 238:R79–R94. doi: 10.1530/JOE-18-0174
50. Kiess W, Anil M, Blum WF, Englaro P, Juul A, Attanasio A, Dötsch J, Rascher W. Serum leptin levels in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus in relation to metabolic control and body mass index. *Eur J Endocrinol* (1998) 138:501–509. doi: 10.1530/eje.0.1380501
51. Hanaki K, Becker DJ, Arslanian SA. Leptin before and after insulin therapy in children with new-onset type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* (1999) 84:1524–1526. doi: 10.1210/jcem.84.5.5653
52. Soliman AT, Omar M, Assem HM, Nasr IS, Rizk MM, El Matary W, El Alaily RK. Serum leptin concentrations in children with type 1 diabetes mellitus: relationship to body mass index, insulin dose, and glycemic control. *Metabolism* (2002) 51:292–296. doi: 10.1053/meta.2002.30502
53. McCormick KL, Mick GJ, Butterfield L, Ross H, Parton E, Totka J. Leptin in children with newly diagnosed type 1 diabetes: effect of insulin therapy. *Int J Exp Diabetes Res* (2001) 2:121–127. doi: 10.1155/edr.2001.121
54. Marques-Oliveira GH, Silva TM, Lima WG, Valadares HMS, Chaves VE. Insulin as a hormone regulator of the synthesis and release of leptin by white adipose tissue. *Peptides* (2018) 106:49–58. doi: 10.1016/j.peptides.2018.06.007
55. Hay N. Akt isoforms and glucose homeostasis - the leptin connection. *Trends Endocrinol Metab* (2011) 22:66–73. doi: 10.1016/j.tem.2010.09.003

56. Dayem SMAE, Kader MAE, Ibrahim S, Mokhtar E, Megeed EAE. Leptin and Lipid Profile in Overweight Patient with Type 1 Diabetes. *Open Access Maced J Med Sci* (2017) 5:131–136. doi: 10.3889/oamjms.2017.033
57. Kim M-H, Kim H. Role of Leptin in the Digestive System. *Front Pharmacol* (2021) 12:660040. doi: 10.3389/fphar.2021.660040
58. Cochrane VA, Wu Y, Yang Z, ElSheikh A, Dunford J, Kievit P, Fortin DA, Shyng S-L. Leptin modulates pancreatic β -cell membrane potential through Src kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptors. *J Biol Chem* (2020) 295:17281–17297. doi: 10.1074/jbc.RA120.015489
59. Kratzsch J, Knerr I, Galler A, Kapellen T, Raile K, Körner A, Thiery J, Dötsch J, Kiess W. Metabolic decompensation in children with type 1 diabetes mellitus associated with increased serum levels of the soluble leptin receptor. *Eur J Endocrinol* (2006) 155:609–614. doi: 10.1530/eje.1.02261
60. Morales A, Wasserfall C, Brusko T, Carter C, Schatz D, Silverstein J, Ellis T, Atkinson M. Adiponectin and leptin concentrations may aid in discriminating disease forms in children and adolescents with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care* (2004) 27:2010–2014. doi: 10.2337/diacare.27.8.2010
61. Szalecki M, Pańkowska E, Wysocka-Mincewicz M, Klupa T, Janas R. [Leptin and soluble leptin receptor in children with type 1 diabetes mellitus]. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab* (2010) 16:262–269.
62. Stipancic G, Sepec MP, Sabolic LLG, Radica A, Skrabic V, Severinski S, Tiljak MK. Clinical characteristics at presentation of type 1 diabetes mellitus in children younger than 15 years in Croatia. *J Pediatr Endocrinol Metab* (2011) 24:665–670. doi: 10.1515/jpem.2011.231
63. Redondo MJ, Siller AF, Gu X, Tosur M, Bondy M, Devaraj S, Sisley S. Sex differences in circulating leptin as a marker of adiposity in obese or overweight adolescents with type 1 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Care* (2020) 8:e001683. doi: 10.1136/bmjdr-2020-001683
64. Kaza M, Tsentidis C, Vlachopapadopoulou E, Sakou I-I, Karanasios S, Mastorakos G, Karavanaki K. The Effect of Metabolic Profile on Leptin, Adiponectin, and hs-CRP in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes. *Children (Basel)* (2022) 9:1162. doi: 10.3390/children9081162
65. Niklowitz P, Rothermel J, Lass N, Barth A, Reinehr T. Bioactive leptin is stronger related to parameters of fat mass and distribution than conventionally measured leptin: Findings from a longitudinal study in obese children participating in a lifestyle intervention. *Clin Chim Acta* (2018) 480:225–229. doi: 10.1016/j.cca.2018.02.020
66. Cawthorne MA, Morton NM, Pallett AL, Liu YL, Emilsson V. Peripheral metabolic actions of leptin. *Proc Nutr Soc* (1998) 57:449–453. doi: 10.1079/pns19980064
67. Porte D, Baskin DG, Schwartz MW. Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr Rev* (2002) 60:S20-29; discussion S68-84, 85–87. doi: 10.1301/002966402320634797
68. Yu X, Park B-H, Wang M-Y, Wang ZV, Unger RH. Making insulin-deficient type 1 diabetic rodents thrive without insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) 105:14070–14075. doi: 10.1073/pnas.0806993105
69. Perry RJ, Petersen KF, Shulman GI. Pleiotropic effects of leptin to reverse insulin resistance and diabetic ketoacidosis. *Diabetologia* (2016) 59:933–937. doi: 10.1007/s00125-016-3909-4

70. Kulkarni RN, Wang ZL, Wang RM, Hurley JD, Smith DM, Ghatei MA, Withers DJ, Gardiner JV, Bailey CJ, Bloom SR. Leptin rapidly suppresses insulin release from insulinoma cells, rat and human islets and, in vivo, in mice. *J Clin Invest* (1997) 100:2729–2736. doi: 10.1172/JCI119818
71. Mainieri F, Tagi VM, Chiarelli F. Treatment Options for Lipodystrophy in Children. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2022) 13:879979. doi: 10.3389/fendo.2022.879979
72. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* (2012) 13:484–492. doi: 10.1038/nrg3230
73. Milagro FI, Campión J, Cordero P, Goyenechea E, Gómez-Uriz AM, Abete I, Zulet MA, Martínez JA. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *FASEB J* (2011) 25:1378–1389. doi: 10.1096/fj.10-170365
74. Ling C, Rönn T. Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Metab* (2019) 29:1028–1044. doi: 10.1016/j.cmet.2019.03.009
75. Kuroda M, Tominaga A, Nakagawa K, Nishiguchi M, Sebe M, Miyatake Y, Kitamura T, Tsutsumi R, Harada N, Nakaya Y, et al. DNA Methylation Suppresses Leptin Gene in 3T3-L1 Adipocytes. *PLoS One* (2016) 11:e0160532. doi: 10.1371/journal.pone.0160532
76. Houde A-A, Légaré C, Biron S, Lescelleur O, Biertho L, Marceau S, Tchernof A, Vohl M-C, Hivert M-F, Bouchard L. Leptin and adiponectin DNA methylation levels in adipose tissues and blood cells are associated with BMI, waist girth and LDL-cholesterol levels in severely obese men and women. *BMC Med Genet* (2015) 16:29. doi: 10.1186/s12881-015-0174-1
77. Guénard F, Deshaies Y, Cianflone K, Kral JG, Marceau P, Vohl M-C. Differential methylation in glucoregulatory genes of offspring born before vs. after maternal gastrointestinal bypass surgery. *Proc Natl Acad Sci USA* (2013) 110:11439–11444. doi: 10.1073/pnas.1216959110
78. Patel P, Selvaraju V, Babu JR, Wang X, Geetha T. Racial Disparities in Methylation of NRF1, FTO, and LEPR Gene in Childhood Obesity. *Genes (Basel)* (2022) 13:2030. doi: 10.3390/genes13112030
79. Elmahdy AG, Ibrahim MM-A, Salama OH, Ziada HEA, Ali MM, Elmohaseb GF, Youssef EM, Bayoumy ES, Bayomy MA, Mohamed SA. Association of the serum chemerin level with the development of diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes mellitus. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol* (2023) 11:171–178. doi: 10.51329/mehdiophthal1461
80. Salah NY, Madkour SS, Ahmed KS, Abdelhakam DA, Abdullah FA, Mahmoud R a. EH. Adiponectin rs1501299 and chemerin rs17173608 gene polymorphism in children with type 1 diabetes mellitus: relation with macroangiopathy and peripheral artery disease. *J Endocrinol Invest* (2024) 47:983–994. doi: 10.1007/s40618-023-02215-z
81. Verrijn Stuart AA, Schipper HS, Tasdelen I, Egan DA, Prakken BJ, Kalkhoven E, de Jager W. Altered plasma adipokine levels and in vitro adipocyte differentiation in pediatric type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* (2012) 97:463–472. doi: 10.1210/jc.2011-1858
82. Elshamawy AAEW, El-Toukhy SE, Seliem NMA, Moustafa RS, Mohammed DS. Apelin and chemerin as promising adipokines in children with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes* (2019) 12:383–389. doi: 10.2147/DMSO.S189264

83. Gu P, Wang W, Yao Y, Xu Y, Wang L, Zang P, Ma J, Yang C, Liang J, Lu B, et al. Increased Circulating Chemerin in Relation to Chronic Microvascular Complications in Patients with Type 2 Diabetes. *Int J Endocrinol* (2019) 2019:8693516. doi: 10.1155/2019/8693516
84. Khaled Y, Rashed L. Serum chemerin levels and chemerin rs17173608 genotypes in the susceptibility of diabetic nephropathy in Egyptian diabetic patients. *Egyptian Journal of Obesity, Diabetes and Endocrinology* (2016) 2:18. doi: 10.4103/2356-8062.184395
85. Zylla S, Pietzner M, Kühn J-P, Völzke H, Dörr M, Nauck M, Friedrich N. Serum chemerin is associated with inflammatory and metabolic parameters-results of a population-based study. *Obesity (Silver Spring)* (2017) 25:468–475. doi: 10.1002/oby.21735
86. Takahashi M, Inomata S, Okimura Y, Iguchi G, Fukuoka H, Miyake K, Koga D, Akamatsu S, Kasuga M, Takahashi Y. Decreased serum chemerin levels in male Japanese patients with type 2 diabetes: sex dimorphism. *Endocr J* (2013) 60:37–44. doi: 10.1507/endocrj.ej12-0201
87. Redondo MJ, Rodriguez LM, Haymond MW, Hampe CS, Smith EO, Balasubramanyam A, Devaraj S. Serum adiposity-induced biomarkers in obese and lean children with recently diagnosed autoimmune type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* (2014) 15:543–549. doi: 10.1111/pedi.12159
88. El Dayem SMA, Battah AA, El Bohy AEM, El Shehaby A, El Ghaffar EA. Relationship of plasma level of chemerin and vaspin to early atherosclerotic changes and cardiac autonomic neuropathy in adolescent type 1 diabetic patients. *J Pediatr Endocrinol Metab* (2015) 28:265–273. doi: 10.1515/jpem-2014-0215
89. Rowicka G, Dyląg H, Chelchowska M, Weker H, Ambroszkiewicz J. Serum Calprotectin and Chemerin Concentrations as Markers of Low-Grade Inflammation in Prepubertal Children with Obesity. *Int J Environ Res Public Health* (2020) 17:7575. doi: 10.3390/ijerph17207575
90. Zheng Y, Rostami Haji Abadi M, Gough J, Johnston JJD, Nour M, Kontulainen S. Higher Body Fat in Children and Adolescents With Type 1 Diabetes-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pediatr* (2022) 10:911061. doi: 10.3389/fped.2022.911061

Rozdział XI. – Streszczenie w języku polskim.

WPROWADZENIE

Pomimo nieocenionego wpływu odkrycia insuliny w leczeniu cukrzycy oraz ogromnego rozwoju nowoczesnych technologii bezsprzecznie wpływających na poprawę leczenia oraz jakości życia pacjentów z cukrzycą, nadal poszukuje się innych czynników wpływających na rozwój i przebieg leczenia tej choroby.

CEL PRACY

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej opartej na cyklu spójnych tematycznie prac badawczych była analiza roli leptyny i chemeryny w patogenezie otyłości i cukrzycy typu 1 u dzieci.

METODY

Badaniem objęto 144 dzieci. W grupie dzieci chorych na cukrzycę 40 pacjentów miało nowo rozpoznaną cukrzycę, 40 dzieci chorowało na cukrzycę dłużej niż rok, 14 dzieci stanowiło grupę kontrolną. W grupie dzieci dłużej chorujących 20 miało dobrą kontrolę metaboliczną co oznaczało poziom HbA1c <7%, 20 złą – poziom HbA1c >7 %. Poziom leptyny, bioleptyny i chemeryny mierzono za pomocą testów immunoenzymatycznych. U 50 dzieci z otyłością oceniono status metylacji promotora genu receptora leptyny metodą COBRA.

WYNIKI

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono niższy poziom leptyny u dzieci z cukrzycą niż u dzieci zdrowych. Dzieci z grupy z nowo rozpoznaną cukrzycą miały statystycznie wyższy poziom leptyny od dzieci z grupy z długotrwałą cukrzycą źle wyrównaną, ale niższy od dzieci z grupy kontrolnej. Dzieci z cukrzycą dobrze wyrównaną metabolicznie miały statystycznie niższy poziom tego hormonu niż dzieci zdrowe. Stwierdzono statystycznie wyższy poziom bioleptyny w grupie dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą w porównaniu do dzieci z cukrzycą długotrwałą źle wyrównaną, ale niższy niż u dzieci zdrowych. W grupie dzieci ze świeżo rozpoznaną cukrzycą poziom bioleptyny był istotnie wyższy u dzieci z prawidłową masą ciała, nadwagą i otyłością niż w grupie dzieci z niedowagą. W grupie dzieci z długotrwałą cukrzycą zaobserwowano wyższe stężenie bioleptyny u chłopców niż u dziewcząt. Nie stwierdzono różnic statystycznych w poziomie chemeryny w badanych grupach dzieci. W przeanalizowanych próbkach nie ujawniono obecności metylacji w badanych wyspach CpG w genie promotora receptora leptyny.

WNIOSKI

Niski poziom leptyny, ale wyższy bioleptyny był charakterystyczny dla pacjentów ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1. Poziom leptyny i bioleptyny, ale nie chemeryny wzrastał wraz ze zwiększającym się BMI. Otyłość u dzieci nie była związana ze zwiększonym poziomem metylacji w genie receptora leptyny. Przeprowadzone badania dostarczają nowych informacji na temat leptyny, bioleptyny i chemeryny u pacjentów pediatrycznych z cukrzycą typu 1 zachęcając do dalszych badań w tym kierunku.

Rozdział XII. – Streszczenie w języku angielskim.

INTRODUCTION

Despite the invaluable impact of insulin discovery on diabetes mellitus treatment and the tremendous advancements in modern technologies undeniably improving the treatment and quality of life for diabetes patients, other factors influencing the disease's development and treatment course are still being investigated.

PURPOSE OF THE DISSERTATION

The purpose of this dissertation, based on a series of thematically consistent research papers, was to analyze the roles of leptin and chemerin in the pathogenesis of obesity and type 1 diabetes in children.

METHODS

The study included 144 children. Among children with diabetes, 40 had newly diagnosed diabetes, 40 had diabetes for more than a year, and 14 served as the control group. In the group of children with longer disease duration, 20 had good metabolic control (HbA1c levels <7%), while 20 had poor metabolic control (HbA1c levels >7%). Levels of leptin, bioleptin, and chemerin were measured using immunoenzymatic assays. In 50 obese children, the promoter methylation status of the leptin receptor gene was assessed using the COBRA method.

RESULTS

The study revealed lower leptin levels in children with diabetes compared to healthy children. Among children with newly diagnosed diabetes, leptin levels were statistically higher than in those with long-term poorly compensated diabetes but lower than in the control group. Children with well-controlled diabetes had statistically lower leptin levels than healthy children. Bioleptin levels were statistically higher in children with newly diagnosed diabetes compared to those with long-term poorly compensated diabetes but remained lower than in healthy children. In the group with newly diagnosed diabetes, bioleptin levels were significantly higher in normal-weight, overweight, and obese children than in underweight children. Among children with long-term diabetes, boys exhibited higher bioleptin levels than girls. No significant differences in chemerin levels were observed between the study groups. Additionally, no methylation was detected in the tested CpG islands of the leptin receptor promoter gene.

CONCLUSIONS

Low leptin levels but higher bioleptin levels were characteristic of patients with newly diagnosed type 1 diabetes. Leptin and bioleptin levels, but not chemerin levels, increased with BMI. Childhood obesity was not associated with increased methylation of the leptin receptor gene. This study provides new insights into the roles of leptin, bioleptin, and chemerin in pediatric type 1 diabetes, highlighting the need for further research in this area.

Rozdział XIII. – Wykaz pozostałego dorobku naukowego.

Udział w konferencjach

1. I Zimowa Szkoła Polskiego Towarzystwa Endokrynologii i Diabetologii Dziecięcej 2014 r. prezentacja przypadku klinicznego pt. „Cukrzyca typu HNF1A u 14 letniej dziewczynki”.
2. IX Podkarpacka Konferencja Endokrynologiczno-Diabetologiczna 2019 r. wykład pt. „Postępowanie w kwasicy ketonowej u dzieci”.
3. Spotkanie w „Zamku Dubiecko” organizowane przez Rzeszowski Oddział Polskiego Towarzystwa Pediatrycznego 2019 r. wykład „Kwasica ketonowa u dzieci”.
4. VIX Zimowa Szkoła Polskiego Towarzystwa Endokrynologii i Diabetologii Dziecięcej, Bielsko Biala 2024 r. prezentacja przypadku klinicznego „Hipoglikemia u dziecka – opis przypadku”.
5. Podkarpacka Szkoła Pompowa, Rzeszów 2025 r. wykład pt. „Pompa Mini Med 780G w praktyce lekarza pediatrii”.

Publikacje

1. Progranulin and Vaspin as Potential Novel Markers in the Etiology of Type 1 Diabetes in Children. Jakubek-Kipa K, Galiniak S, Mazur A. *Medicina (Kaunas)*. 2024;60(7):1165. doi: 10.3390/medicina60071165. IF=2,4; MEiN=40
2. Diabetic ketoacidosis incidence among children with new-onset type 1 diabetes in Poland and its association with COVID-19 outbreak-Two-year cross-sectional national observation by PolPeDiab Study Group. Pietrzak I, Michalak A, Seget S, Bednarska M, Beń-Skowronek I, Bossowski A, Chobot A, Dzygał K, Głowińska-Olszewska B, Górnicka M, Horodnicka-Józwa A, Jakubek-Kipa K, Jarosz-Chobot P, Marcinkiewicz K, Mazur A, Myśliwiec M, Nazim J, Niechciał E, Noczyńska A, Rusak E, Seifert M, Skotarczyk-Kowalska E, Skowronek A, Szypowska A, Wais P, Walczak M, Wołoszyn-Durkiewicz A, Wysocka-Mincewicz M, Zubkiewicz-Kucharska A, Szadkowska A. *Pediatr Diabetes*. 2022;23(7):944-955. doi: 10.1111/pedi.13379. IF=3,4; MEiN=140
3. Relative leptin deficiency in children with severe early-onset obesity (SEOO) - results of the Early-onset Obesity and Leptin - German-Polish Study (EOL-GPS). Zachurzok A, Ranke MB, Flehmig B, Jakubek-Kipa K, Marcinkiewicz K, Mazur A, Petriczko E, Pridzun L, von Schnurbein J, Walczak M, Malecka-Tendera E, Wabitsch M, Brandt S. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2020;33(2):255-263. doi: 10.1515/jpem-2019-0469. IF=1,634; MEiN=40
4. Trendy w występowaniu nadwagi i otyłości u dzieci na świecie, w Europie i w Polsce. Trends in prevalence of childhood overweight and obesity on the World, in Europe and in Poland. Kędzior A, Jakubek-Kipa K, Brzuszek M, Mazur A. *Pediatric Endocrinology/Endokrynologia Pediatryczna*. 2017;16(1):41-48. doi: 10.18544/EP-01.16.01.1662. MEiN=9

5. Opóźnione dojrzewanie. Dąbek N, Jakubek-Kipa K, Mazur A. *Pediatrics po Dyplomie*. 2016;20(wyd.specj.1):44-52. MEiN=3
6. Cukrzyca typu HNF1A MODY u 14-letniej dziewczynki z otyłością. Jakubek-Kipa K, Lisowicz L, Klupa T, Mazur A. *Pediatrics Polska*. 2014;89(6):449-452. MEiN=5
7. Przedwczesne dojrzewanie płciowe. Jakubek-Kipa K, Drachal E, Mazur A. *Pediatrics po Dyplomie*. 2014;5:27-35. MEiN=3
8. Niespokojne niemowlę w izbie przyjęć. Jakubek-Kipa K, Kamela A, Mazur A. *Pediatrics po Dyplomie*. 2013;3:46-52. MEiN=3

Rozdział

1. Jakubek-Kipa K, Tabarkiewicz J, Mazur A. Rola czynników genetycznych w rozwoju otyłości u dzieci Tytuł całości: W: Endokrynologia wieku rozwojowego/redakcja naukowa Beata Pyrżak, Mieczysław Walczak. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2023. p-ISBN: 978-83-01-22755-5. MEiN=20

Rozdział XVI. – Oświadczenia współautorów publikacji.

Prof. dr hab. n. med. Artur Mazur

Zuzio dnia *4.12.2023 r.*

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Jako współautor prac pt.

1. Bioleptin as a useful marker of metabolic status in children with diabetes mellitus type 1.
Jakubek-Kipa K, Galiniak S, Łagowska K, Krupa I, Ludwin A, Tabarkiewicz J, Mazur A.
Front Endocrinol (Lausanne). 2023 Aug 21;14:1235409. doi: 10.3389/fendo.2023.1235409.
eCollection 2023.

2. Role of chemerin in the metabolic regulation of type I diabetes in children. Jakubek-Kipa
K, Galiniak S, Mazur A. Pediatría i Medycyna Rodzinna. 2024;20(2):209-214. doi:
10.15557/PiMR.2024.0030.

3. Methylation status of leptin receptor gene promoter in obese children.
Katarzyna Jakubek-Kipa; Natalia Potocka; Marzena Skrzypa; Łukasz Dembiński; Izabela
Zawlik; Artur Mazur. In: Pediatría Polska. 2020 iss(2):86-91

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie wyżej wymienionych prac w formie publikacji to:

- nadzór merytoryczny
- opracowanie koncepcji badań klinicznych wspólnie z doktorantką
- weryfikacja i akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu

jednocześnie oświadczam, że wyrażam zgodę na:

- uznanie w/w prac przedłożonych przez lek. Katarzynę Jakubek-Kipa jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych na temat roli leptyny i chemeryny w patogenezie otyłości i cukrzycy typu I u dzieci.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wskazuje na indywidualny wkład lek. Katarzyny Jakubek-Kipa przy opracowaniu koncepcji badania, zbieraniu danych, udziale w opracowaniu i interpretacji wyników badań oraz przygotowanie wszystkich artykułów do druku.

Zuzio

Prof. dr hab. n. med. ARTUR MAZUR
Specjalista Chorób Dziecięcych
Endokrynolog i Diabetolog Dziecięcy
11 655 53 95

Rzeszów, dnia 3.12.2024

Dr hab. n. med. Sabina Galiniak

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Jako współautor prac pt.

1. *Bioleptin as a useful marker of metabolic status in children with diabetes mellitus type 1. Jakubek-Kipa K, Galiniak S, Łagowska K, Krupa I, Ludwin A, Tabarkiewicz J, Mazur A. Front Endocrinol (Lausanne). 2023;14:1235409. doi: 10.3389/fendo.2023.1235409.*

2. *Role of chemerin in the metabolic regulation of type I diabetes in children. Jakubek-Kipa K, Galiniak S, Mazur A. Pediatra i Medycyna Rodzinna. 2024;20(2):209-214. doi: 10.15557/PiMR.2024.0030.*

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie wyżej wymienionych prac w formie publikacji to:

- przeprowadzenie wspólnie z doktorantką analizy literatury oraz wyników
- współudział w redagowaniu artykułu
- weryfikacja i akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu

jednocześnie oświadczam, że wyrażam zgodę na:

- uznanie w/w prac przedłożonych przez lek. Katarzynę Jakubek-Kipa jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych na temat roli leptyny i chemeryny w patogenezie otyłości i cukrzycy typu 1 u dzieci.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wskazuje na indywidualny wkład lek. Katarzyny Jakubek-Kipa przy opracowaniu koncepcji badania, zbieraniu danych, udziale w opracowaniu i interpretacji wyników badań oraz przygotowaniu wszystkich artykułów do druku.

Sabina Galiniak

Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Jacek Tabarkiewicz

Rzeszów dnia 13.06.2024

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Jako współautor pracy pt.

1. Bioleptin as a useful marker of metabolic status in children with diabetes mellitus type 1. Jakubek-Kipa K, Galiniak S, Łagowska K, Krupa I, Ludwin A, Tabarkiewicz J, Mazur A. Front Endocrinol (Lausanne). 2023 Aug 21;14:1235409. doi: 10.3389/fendo.2023.1235409. eCollection 2023.

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie wyżej wymienionej pracy w formie publikacji to:

- nadzór merytoryczny
- weryfikacja i akceptacja finalnej wersji manuskryptu

jednocześnie oświadczam, że wyrażam zgodę na:

- uznanie w/w pracy przedłożonej przez lek. Katarzynę Jakubek-Kipa jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych na temat roli leptyny i chemeryny w patogenezie otyłości i cukrzycy typu I u dzieci.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wskazuje na indywidualny wkład lek. Katarzyny Jakubek-Kipa przy opracowaniu koncepcji badania, zbieraniu danych, udziale w opracowaniu i interpretacji wyników badań oraz przygotowaniu artykułu do druku.

Uniwersytet Rzeszowski
Kierownik
Zakładu Immunologii Człowieka

prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Jacek Tabarkiewicz

mgr Aleksandra Ludwin

Rzeszów, dnia 21.06.2024

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Jako współautor pracy pt.

1. Bioleptin as a useful marker of metabolic status in children with diabetes mellitus type 1. Jakubek-Kipa K, Galiniak S, Łagowska K, Krupa I, Ludwin A, Tabarkiewicz J, Mazur A. Front Endocrinol (Lausanne). 2023 Aug 21;14:1235409. doi: 10.3389/fendo.2023.1235409. eCollection 2023.

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie wyżej wymienionych prac w formie publikacji to:

- udział w pracach badawczych dotyczących analizy molekularnej oraz opracowaniu wyników

jednocześnie oświadczam, że wyrażam zgodę na:

- uznanie w/w prac przedłożonych przez lek. Katarzynę Jakubek-Kipa jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych na temat roli leptyny i chemeryny w patogenezie otyłości i cukrzycy typu I u dzieci.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wskazuje na indywidualny wkład lek. Katarzyny Jakubek-Kipa przy opracowaniu koncepcji badania, zbieraniu danych, udziale w opracowaniu i interpretacji wyników badań oraz przygotowanie wszystkich artykułów do druku.

Aleksandra Ludwin

mgr Izabela Krupa

Racibórz.....dnia *1.07.2024*.....

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Jako współautor pracy pt.

1. Bioleptin as a useful marker of metabolic status in children with diabetes mellitus type 1.
Jakubek-Kipa K, Galiniak S, Łagowska K, Krupa I, Ludwin A, Tabarkiewicz J, Mazur A. Front
Endocrinol (Lausanne). 2023 Aug 21;14:1235409. doi: 10.3389/fendo.2023.1235409.
eCollection 2023.

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie wyżej wymienionej pracy w formie publikacji to:

- bankowaniu materiału biologicznego
- udział w pracach badawczych dotyczących analizy stężeń badanych cytokin oraz opracowaniu wyników

jednocześnie oświadczam, że wyrażam zgodę na:

- uznanie w/w pracy przedłożonej przez lek. Katarzynę Jakubek-Kipa jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych na temat roli leptyny i chemeryny w patogenezie otyłości i cukrzycy typu I u dzieci.

Oświadczam, że samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wskazuje na indywidualny wkład lek. Katarzyny Jakubek-Kipa przy opracowaniu koncepcji badania, zbieraniu danych, udziale w opracowaniu i interpretacji wyników badań oraz przygotowaniu artykułu do druku.

mgr inż. Izabela Krupa

mgr Katarzyna Łagowska

Przesłaładnia 08.07.2024

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Jako współautor pracy pt.

1. Boleptin as a useful marker of metabolic status in children with diabetes mellitus type 1. Jakubek-Kipa K, Galiniak S, Łagowska K, Krupa I, Ludwin A, Tabarkiewicz J, Mazur A. Front Endocrinol (Lausanne). 2023 Aug 21;14:1235409. doi: 10.3389/fendo.2023.1235409. eCollection 2023.

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie wyżej wymienionej pracy w formie publikacji to:

- udział w pracach badawczych dotyczących analizy biochemicznej oraz opracowaniu wyników

jednocześnie oświadczam, że wyrażam zgodę na:

- uznanie w/w pracy przedłożonej przez lek. Katarzynę Jakubek-Kipa jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych na temat roli leptyny i chemeryny w patogenezie otyłości i cukrzycy typu I u dzieci.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wskazuje na indywidualny wkład lek. Katarzyny Jakubek-Kipa przy opracowaniu koncepcji badania, zbieraniu danych, udziale w opracowaniu i interpretacji wyników badań oraz przygotowaniu artykułu do druku.

Katarzyna Łagowska

Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik

Zawlikdnia.....*20.06.2024*

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Jako współautor pracy pt.

1. Methylation status of leptin receptor gene promoter in obese children, Katarzyna Jakubek-Kipa; Natalia Potocka; Marzena Skrzypa; Łukasz Dembiński; Izabela Zawlik; Artur Mazur. Pediatra Polska. 2020;95(2):86–91. doi: 10.5114/polp.2020.97117.

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie wyżej wymienionej pracy w formie publikacji to:

- nadzór merytoryczny
- weryfikacja i akceptacja finalnej wersji manuskryptu

jednocześnie oświadczam, że wyrażam zgodę na:

- uznanie w/w pracy przedłożonej przez lek. Katarzynę Jakubek-Kipa jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym na temat roli leptyny i chemeryny w patogenezie otyłości i cukrzycy typu I u dzieci.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wskazuje na indywidualny wkład lek. Katarzyny Jakubek-Kipa przy opracowaniu koncepcji badania, zbieraniu danych, udziale w opracowaniu i interpretacji wyników badań oraz przygotowanie wszystkich artykułów do druku.

Uniwersytet Rzeszowski
Instytut Nauk Medycznych
Kierownik Zakładu Genetyki Ogólnej
Izabela Zawlik
Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik

dr n. med. Marzena Skrzypa

20.06.....dnia.....2024 r.

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA

Jako współautor pracy pt.

1. Methylation status of leptin receptor gene promoter in obese children, Katarzyna Jakubek-Kipa; Natalia Potocka; Marzena Skrzypa; Łukasz Dembiński; Izabela Zawlik; Artur Mazur. Pediatra Polska. 2020;95(2):86–91. doi: 10.5114/polp.2020.97117.

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie wyżej wymienionej pracy w formie publikacji to:

- udział w pracach badawczych dotyczących analizy molekularnej oraz opracowaniu wyników
- weryfikacja i akceptacja finalnej wersji manuskryptu

jednocześnie oświadczam, że wyrażam zgodę na:

- uznanie w/w pracy przedłożonej przez lek. Katarzynę Jakubek-Kipa jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym na temat roli leptyny i chemeryny w patogenezie otyłości i cukrzycy typu I u dzieci.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wskazuje na indywidualny wkład lek. Katarzyny Jakubek-Kipa przy opracowaniu koncepcji badania, zbieraniu danych, udziale w opracowaniu i interpretacji wyników badań oraz przygotowanie wszystkich artykułów do druku.

dr Skrzypa

dr n. med. Natalia Potocka

Przebieg.....dnia *20.06.2024*

(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Jako współautor pracy pt.

1. Methylation status of leptin receptor gene promoter in obese children, Katarzyna Jakubek-Kipa; Natalia Potocka; Marzena Skrzypa; Łukasz Dembiński; Izabela Zawlik; Artur Mazur. Pediatría Polska. 2020;95(2):86–91. doi: 10.5114/polp.2020.97117.

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie wyżej wymienionej pracy w formie publikacji to:

- udział w pracach badawczych dotyczących analizy molekularnej oraz opracowaniu wyników
- weryfikacja i akceptacja finalnej wersji manuskryptu

jednocześnie oświadczam, że wyrażam zgodę na:

- uznanie w/w pracy przedłożonej przez lek. Katarzynę Jakubek-Kipa jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym na temat roli leptyny i chemeryny w patogenezie otyłości i cukrzycy typu I u dzieci.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wskazuje na indywidualny wkład lek. Katarzyny Jakubek-Kipa przy opracowaniu koncepcji badania, zbieraniu danych, udziale w opracowaniu i interpretacji wyników badań oraz przygotowanie wszystkich artykułów do druku.

Natalia Potocka

Dr n. med. i n. o zdr. Łukasz Dembiński
(tytuł zawodowy, imię i nazwisko)

WARSZAWAdnia 08.07.2024

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Jako współautor pracy pt.

*1. Methylation status of leptin receptor gene promoter in obese children,
Katarzyna Jakubek-Kipa; Natalia Potocka; Marzena Skrzypa; Łukasz Dembiński; Izabela Zawlik;
Artur Mazur. In: Pediatría Polska. 2020 iss(2):86-91*

Oświadczam, że mój wkład w przygotowanie wyżej wymienionej pracy w formie publikacji to:

- weryfikacja i akceptacja finalnej wersji manuskryptu

jednocześnie oświadczam, że wyrażam zgodę na:

- uznanie w/w pracy przedłożonej przez lek. Katarzynę Jakubek-Kipa jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych na temat roli leptyny i chemeryny w patogenezie otyłości i cukrzycy typu I u dzieci.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w prac wskazuje na indywidualny wkład lek. Katarzyny Jakubek-Kipa przy opracowaniu koncepcji badania, zbieraniu danych, udziale w opracowaniu i interpretacji wyników badań oraz przygotowanie wszystkich artykułów do druku.



Rozdział XV. – Zgody komisji bioetycznej.



KOMISJA BIOETYCZNA UNIwersYTETU RZESZOWSKIEGO
UNIwersYTET RZESZOWSKI
ul. Warszawska 26 A, 35-205 Rzeszów
tel. (017) 872 19 25

UCHWAŁA Nr 2018/03/10

Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Rzeszowskim

2018/03/08

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Rzeszowskim, działając na podstawie art. 29 ust. 3 pkt 2 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z dnia 26 marca 1997 roku, Nr 28, poz.152), zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 roku (Dz. U. Nr 47 poz. 480 z 1999 roku) w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania Komisji Bioetycznych, po zapoznaniu się z wnioskiem obejmującym również zgłoszenie badania oraz po wysłuchaniu dodatkowych informacji złożonych przez wnioskodawcę, w wyniku przeprowadzonej dyskusji i głosowania,

postanawia

projekt badawczy: „Ocena wybranych parametrów biochemicznych, immunologicznych oraz genetycznych i ich korelacje z wykładnikami klinicznymi choroby u pacjentów chorych na pediatryczne choroby autoimmunizacyjne”

zaopiniować pozytywnie.

Uwagi: Uchwała jest ważna na okres objęty planem badań.

Do wiadomości:

Wnioskodawca

lek. med. Małgorzata Dąbrowska, lek. med. Lucyna Lisowicz, lek. med. Katarzyna Jakubek-Kipa, lek. med. Katarzyna Wiącek, dr hab. n. med. Artur Mazur, dr hab. n. med. Jacek Tabarkiewicz, prof. UR

UNIwersytet Rzeszowski
KOMISJA BIOETYCZNA
ul. Warszawska 26A
35-205 Rzeszów
tel. 017 872-19-20, fax 017 872-11-00

UCHWAŁA Nr 22/04/2016

Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Rzeszowskim

z dnia 20 kwietnia 2016 roku

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Rzeszowskim, działając na podstawie art. 29 ust. 3 pkt 2 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza (Dz. U. z dnia 26 marca 1997 roku, Nr 28, poz.152), zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 roku (Dz. U. Nr 47 poz. 480 z 1999 roku) w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania Komisji Bioetycznych, po zapoznaniu się z wnioskiem obejmującym również zgłoszenie badania oraz po wysłuchaniu dodatkowych informacji złożonych przez wnioskodawcę, w wyniku przeprowadzonej dyskusji i głosowania,

postanawia

projekt badawczy: „Ocena częstości występowania zmian epigenetycznych pod postacią metylacji w obrębie genu receptora leptynowego u dzieci”

zaopiniować pozytywnie.

Uwagi: Uchwała jest ważna na okres objęty planem badań.

Do wiadomości:

Wnioskodawcy

Lek med. Katarzyna Jakubek-Kipa, dr.hab.n.med. Izabela Zawlik, prof.UR, dr hab. n. med.

Artur Mazur, prof. UR

PRZEWODNICZĄCY
KOMISJI BIOETYCZNEJ UR

dr n. med. Mariusz Dąbrowski