Povezanost polimorfizma gena FTO s tjelesnom masom i mikrobiomom usne šupljine u žena Zagrebačke županije

Škara, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:275957

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Lucija Škara

Povezanost polimorfizma gena *FTO* s tjelesnom masom i mikrobiomom usne šupljine u žena Zagrebačke županije

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu i u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom prof.dr.sc. Višnje Bačun-Družina, redovite profesorice na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

ZAHVALE

Nisam baš tip osobe koja često govori hvala, riječima, ali sad ću to pokušati nadoknaditi.

Prvo, hvala mojim divnim roditeljima što su me podržali u naumu da studiram molekularnu biologiju iako im je to bilo potpuno nepoznato područje. Hvala mom bratu koji bi me svako malo iznenadio slikama doma, dragih osoba i aktualnih događaja.

Hvala srdačnoj mentorici prof. dr.sc. Višnji Bačun-Družina na posvećenom vremenu, novom iskustvu i znanju te stečenim novim prijateljstvima i poznanstvima.

Hvala suvoditeljici prof. dr.sc. Mirni Ćurković Perica na suradnji i brizi.

Hvala ljudima iz Laboratorija za molekularnu i staničnu biologiju sa Instituta Ruđer Bošković na gostoprimstvu i udijeljenim vrijednim savjetima, informacijama i ,,trikovima“ .

Hvala svim prijateljima koji su učinili da mi ova tuđina i tmurni Zagreb bude sunčan.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Povezanost polimorfizma gena *FTO* s tjelesnom masom i mikrobiomom usne šupljine u žena Zagrebačke županije

Lucija Škara
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Pretilost je rastući problem diljem svijeta. Nastaje kao posljedica kronične neravnoteže unosa i potrošnje energije. Etiologija pretilosti je vrlo složena, a procjenjuje se da su genetičke razlike među pojedincima uzrok 40 – 70% razlike u sklonosti razvoju pretilosti. Gen *FTO* (eng. *Fat mass and obesity-associated*) gen je s najvećim efektom na indeks tjelesne mase i rizik razvoja pretilosti. Cilj ovog rada je bio utvrditi razlike u distribuciji polimorfizma rs9939609 (AA, AT ili TT) gena *FTO* i razlike u sastavu mikroorganizama usne šupljine u pretilih osoba i osoba normalne tjelesne mase. Brojnim studijama na različitim populacijama potvrđeno je da je polimorfizam rs9939609 u prvom intronu gena *FTO* povezan s povećanom sklonošću razvoja pretilosti i dijabetesa tipa 2, a ovim istraživanjem i metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu ustanovljena je učestalost tog polimorfizma u žena Zagrebačke županije. Identifikacijom mikroorganizama iz sline ispitana je razlika mikrobioma dvije ispitivane skupine. Ispitanice su ispunile i upitnik koji je dao uvid u njihov način života, prehrane i bolesti te su ti podaci upotpunili rezultate genotipizacije i identifikacije bakterija usne šupljine. Dobiveni rezultati trebali bi pridonijeti boljem razumijevanju uloge polimorfizma rs9939609 gena *FTO*, mikrobioma usne šupljine i načina života u razvoju pretilosti na ovom području.

(46 stranica, 13 slika, 10 tablica, 114 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: pretilost, gen *FTO,* rs9939609, mikroorganizmi usne šupljine

Voditeljica: prof.dr.sc. Višnja Bačun Družina, redovita profesorica na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu

Suvoditeljica: prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica, PMF

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Mirna Ćurković Perica, PMF

izv. prof. dr. sc. Vesna Benković, PMF

izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, PMF

Rad prihvaćen: 28.04.2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Association study of *FTO* gene polymorphism with body mass and oral microbiome in women from the Zagreb Region

Lucija Škara
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Obesity is a growing problem all over the world and results from chronic imbalance of energy intake and energy expenditure. The etiology of obesity is very complex. It is estimated that the genetic differences among individuals cause 40 - 70% of the difference in susceptibility to develop obesity. The gene *FTO* (eng. *Fat mass and obesity-associated*) is a gene with the largest effect on body mass index and the risk of developing obesity. The aim of this study is to determine the differences in the distribution of each genotype polymorphism rs9939609 (AA, AT or TT) and differences in oral microbiome between obese and normal weight individuals. Many studies on various populations confirmed association of the polymorphism rs9939609 in the first intron of the *FTO* gene with an increased susceptibility of obesity development and type 2 diabetes, and with this study by *real-time* PCR frequency of this polymorphism in women Zagreb County was determined. The difference in the microbiome was revealed by identification of the microorganisms from saliva of the two tested groups. Participants completed a questionnaire that gave insight into their lifestyle, diet and diseases and these data supplemented the results of genotyping and identification of bacteria of the oral cavity. The results of this study should contribute to a better understanding of the role of *FTO* gene polymorphism rs9939609, oral microbiome and lifestyle in the development of obesity in this area.

(46 pages, 13 figures, 10 tables, 114 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: obesity, *FTO* gene, rs9939609, oral microbiome

Supervisor: Dr.sc. Višnja Bačun Družina, Prof., Faculty of Food Technology and Biotechnology

Cosupervisor: Dr. sc. Mirna Ćurković Perica, Prof., Faculty of Science

Reviewers: dr. sc. Mirna Ćurković Perica, Prof., Faculty of Science

dr. sc. Vesna Benković, Asst. Prof., Faculty of Science

dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, Asst. Prof., Faculty of Science

Thesis accepted: 28.04.2016.

SADRŽAJ

1. Uvod 1

1.1. Pretilost 1

1.2 Indeks tjelesne mase 2

1.3 Genetska podloga pretilosti 3

1.4 Gen *FTO* 4

1.4.1 Gen *FTO* i komorbiditeti povezani s pretilošću 6

1.4.2 Polimorfizmi gena *FTO* 7

1.4.3 Polimorfizam rs9939609 7

1.5 Mikrobiom usne šupljine 8

1.6 Životne navike, bolesti i pretilost 9

2. Cilj istraživanja 10

3. Materijal i metode 11

3.1 Ispitanici 11

3.2 Određivanje genotipa rs993960 gena FTO 11

3.2.1 Izolacija DNA iz krvi 14

3.2.2 Određivanje genotipa metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu 13

3.3. Identifikacija mikroorganizama 15

3.3.1. Hranjive podloge 15

3.3.2 Izolacija čistih kultura 16

3.3.3 Identifikacija mikroorganizama masenom spektrometrijom 16

3.4 Anketa 17

3.5 Statistička obrada podataka 19

4. Rezultati 20

4.1. Rezultati ankete 20

4.2 Distribucija genotipova polimorfizma rs9939609 u žena iz kontrolne skupine i pretilih žena 23

4.3 Raznolikost mikrobioma usne šupljine u žena iz kontrolne skupine i pretilih žena..... 26

5. Rasprava..... 31

6. Zaključci..... 33

7. Literatura..... 34

8. Životopis 46

1. UVOD

1.1. Pretilost

Pretilost se smatra metaboličkim sindromom, a nastaje kao posljedica kronične neravnoteže unosa i potrošnje energije što vodi ka skladištenju viška triglicerida u masnom tkivu (O'Rahilly 2009). Taj višak povezan je s brojnim patološkim stanjima i bolestima kao što su: hiperlipidemija (Dattilo i Kris-Etherton 1992), bolest koronarnih arterija (Lavie i Milani 1997), moždani udar (Kurth i sur. 2005), dijabetes tipa 2 (Sjostrom i sur. 2004; Avenell i sur 2004; Sharma 2006), hipertenzija (Huang i sur. 1998), nealkoholna masna bolest jetre (Suzuki i sur. 2005), osteoartritis (Hart i Spector 1993) i respiratorni problemi (Kales i sur. 1985; Thomson i sur. 2003). S pretilošću je povezan i povećan rizik od nekih oblika ponašanja: poremećaj pozornosti s hiperaktivnošću, niža inteligencija i razni anksiozni poremećaji. (Anderson i sur. 2007; Yang i sur. 2013; Cserjesi i sur. 2007). Pretilost poprima epidemijske razmjere (Slika 1.) i još uvijek je u porastu diljem svijeta (Finucane i sur. 2011; Ng i sur. 2014). Učestala pojavnost pretilosti i povećane tjelesne mase predstavlja važan svjetski problem. Epidemiološke studije procjenjuju da se učestalost pretilosti/povećane tjelesne mase između 1980. i 2013. godine povećala za 41%. U nekim državama kao što su Kiribati, Savezne Države Mikronezije, Libija, Katar i Samoa procijenjena prevalencija pretilosti u odraslih prelazi 50% populacije (Ng i sur. 2014).

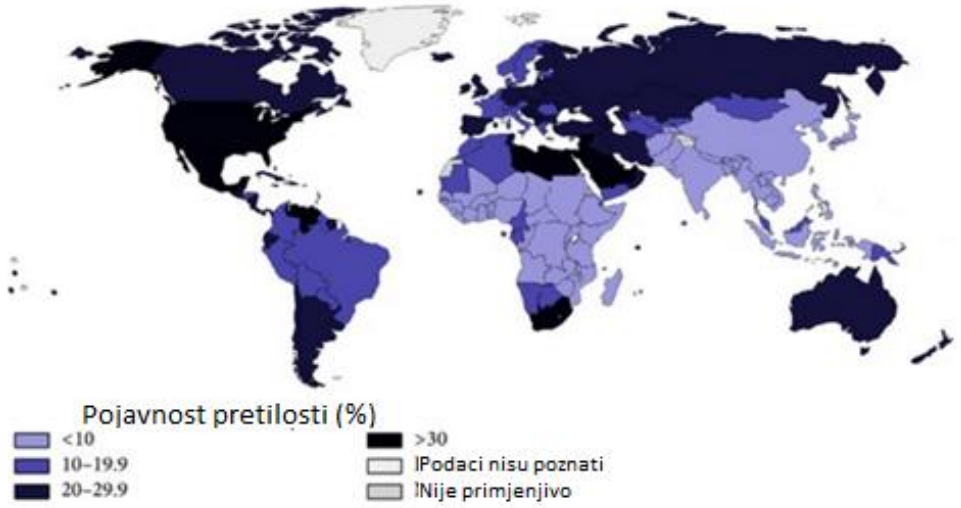
Također, zabrinjavajući su podaci i za Republiku Hrvatsku koja zauzima visoko 5. mjesto na ljestvici „debelih" država Europe te 71. mjesto na ljestvici od 194 istraživane države svijeta.

U Republici Hrvatskoj 63% Hrvata i 54% Hrvatica ima prekomjernu tjelesnu masu, a pretilo ih je 20%, podjednako muškaraca i žena (http://www.zzjzpgz.hr).

Posebno je zabrinjavajući brzi rast stope pretilosti djece i adolescenata širom svijeta, u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju, što ih već u ranoj dobi čini sklonijima slabijem zdravlju. Predviđana kažu da će do 2020. g. 86% stanovnika S.A.D.-a biti pretilo (Flegal i sur. 2012).

Osim lošeg utjecaja na zdravlje, pretilost ima velik utjecaj i na troškove zdravstvenih usluga. Trošak liječenja pretile osobe je za 1 429 $ veći od troška liječenja osobe normalne tjelesne mase (Emambokus i Wang 2010).

Iz prethodno navedenih podataka možemo vidjeti da pretilost predstavlja vrlo ozbiljan zdravstveni i ekonomski problem.



Slika 1. Ukupni postotak učestalosti pretilosti u svijetu 2008. godine (preuzeto i prilagođeno prema World Health Organization 2008)

1.2 Indeks tjelesne mase

Pretile osobe su osobe čiji je indeks tjelesne mase (eng. *body mass index*, BMI) veći od 30 kg/m^2 . BMI se koristi kao zamjensko mjerilo globalne pretilosti. Računa se kao masa u kilogramima podijeljena s kvadratom visine u metrima. Prema Nacionalnom institutu za srce, pluća i krv (eng. *National Heart, Lung, and Blood Institute*) BMI se dijeli u 4 kategorije: pothranjenost (<18,5 kg/m^2), normalna tjelesna masa (18,5 – 24,9 kg/m^2), prekomjerna tjelesna masa (25–29,9 kg/m^2) i pretilost (>30 kg/m^2). Pretilost je potom dalje podijeljena u tri podgrupe: klasa I (BMI 30 – 34,9 kg/m^2), klasa II (BMI 35 – 39,9 kg/m^2) i klasa III (BMI >40 kg/m^2), koja se još naziva i morbidna ili ekstremna pretilost (WHO 2000).

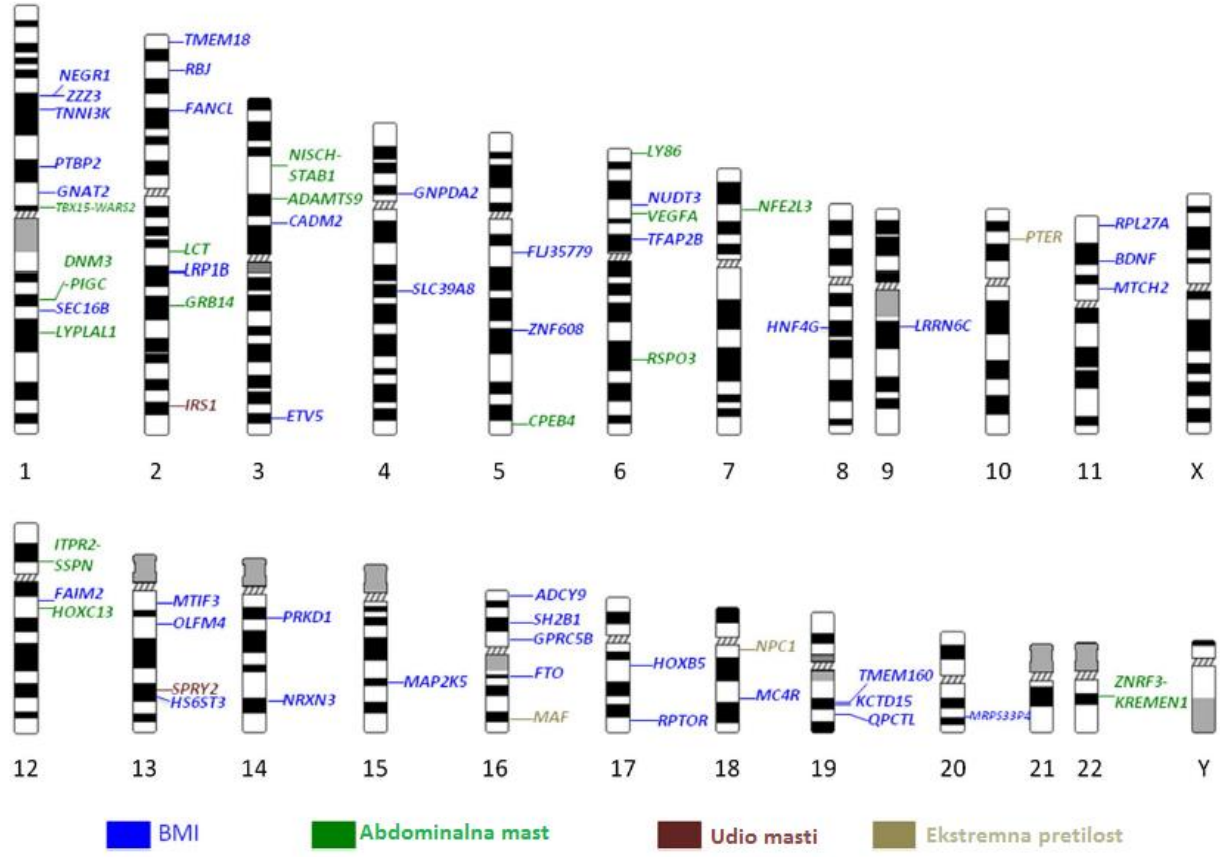
Za pojedine etničke skupine korištene su drugačije granice. Na primjer, Azijati s BMI-om >23 kg/m^2 se ubrajaju u kategoriju osoba prekomjerne tjelesne mase, a oni s BMI-om >27,5 kg/m^2 se ubrajaju u kategoriju pretilih osoba (Ramachandran i sur. 2012).

Iako se BMI često koristi, on nije savršena mjera za debljinu jer može precijeniti tjelesnu mast u fizički aktivnih osoba te podcijeniti tjelesnu mast u starijih osoba i osoba koje su izgubile mišićnu masu. Stoga je predložena alternativna mjera centralne i visceralne pretilosti, a to je opseg struka veći od 88 cm za žene i opseg struka veći od 102 cm za muškarce (Anon 2001).

1.3. Genetska podloga pretilosti

Etiologija pretilosti je složena, a obično je rezultat interakcije okoliša, načina života i genetike (Nguyen i El-Serag 2010).

Nasljednost BMI-a je konzistentno procjenjivana na otprilike 40-70% (Allison i sur. 1994; Chagnon i sur. 1997; Chung 2012; Goran 1997). Gotovo na svakom ljudskom kromosomu (Slika 2.) nađeni su lokusi povezani s predispozicijom za pretili fenotip (BMI, abdominalna mast, udio masti ili ekstremna pretilost) (Albuquerque i sur. 2015).



Slika 2. Lokusi povezani sa pretilim fenotipom (preuzeto i prilagođeno prema Albuquerque i sur. 2015)

S obzirom na genetsku etiologiju pretilost se može podijeliti u tri skupine: monogenska, sindromska i poligenska pretilost.

Monogenska pretilost je izrazito teška pretilost. Rezultat je defekta jednog gena, a gen koji uzrokuje ovakav fenotip je poznat. U istraživanjima ove vrste pretilosti dosad su identificirane genske varijante u osam gena čime se objasnilo do 10% slučajeva ekstremnih pretilosti s ranim nastankom. Ti geni kodiraju za leptin, leptinski receptor, prokonvertazu I, pro-opiomelanokortin, melanokortin-4 receptor, neurotrofni moždani faktor, receptor neurotrofne tirozin kinaze tipa 2 i tkz. jedno-skloni homolog 1 (eng. single-minded homolog

1) (Farooqi i O'Rahilly 2005; Ranadive i Vaisse 2008; Gonzalez-Jimenez i sur. 2012). Svi defekti nalaze se u genima koji kodiraju za proteine u signalnom putu leptin-melanokortin u središnjem živčanom sustavu pa su stoga ključni za regulaciju energetske homeostaze cijelog tijela. Ove mutacije su rijetke u općoj populaciji i ne vode samo k ekstremnoj pretilosti s ranim nastankom nego i k dodatnim fenotipskim karakteristikama kao što su: crvena kosa (mutacija u genu za pro-opiomelanokortin), smanjena plodnost (mutacije u genima za prokonvertazu I, leptin i leptinski receptor), adrenalna insuficijencija (mutacija u genu za pro-opiomelanokortin) i oslabljen imunitet (mutacija u genu za leptinski receptor) (Farooqi i sur. 1999; Farooqi i O'Rahilly 2005; Farooqi 2006).

Sindromska pretilost je rezultat diskretnih genskih defekata ili kromosomskih abnormalnosti na nekoliko gena, autosomalnih ili X-vezanih. Postoji oko 30 rijetkih sindroma i oni su povezani s mentalnom retaradacijom, dismorfičkim znakovima i nenormalnostima pojedinih organa. Najčešći takvi sindromi su Bardet-Biedlov sindrom, Prader-Willijev sindrom i sindrom WAGR (Wilmsov tumor, aniridija, genitourinarne anomalije i mentalna retardacija), a pretilost se javlja kao simptom (Farooqi 2005; Bell i sur. 2005).

Poligenska pretilost rezultat je postojanja varijacija DNA u multiplim genima istovremeno. Pojedina poligenska varijanta sama malo doprinosi fenotipu, ali u kombinaciji s drugim predisponirajućim varijantama ima poprilično velik utjecaj na fenotip. Ako osoba ima mnogo takvih poligenskih varijanti za povećanu tjelesnu masu može doći do nastanka pretilosti, a svaka varijanta ima veću pojavnost u pretilih osoba nego u osoba normalne mase. Procjenjuje se da ukupan broj takvih gena s malim utjecajem najvjerojatnije prelazi 100 (Hinney i Hebebrand 2008). Yang i sur. (2011) procijenili su da je 17% varijacije BMI-a posljedica čestih genetskih promjena, a istraživanje na blizancima otkriva da bi taj aditivni efekt multiplih polimorfizama mogao objasniti 37% BMI-a (Llewellyn i sur. 2013). Povezanost genskih varijanti i čestih poremećaja kao što je pretilost mogla bi biti uključena u dijagnosticiranje, predviđanje rizika, prevenciju i liječenje. Gen *FTO* (eng. *Fat mass and obesity associated gene*) i gen za receptor melanokortina 4 dva su gena s malim, ali ponovljivim i jasnim utjecajem na tjelesnu masu (Frayling i sur. 2007; Dina i sur. 2007; Scott i sur. 2007; Scuteri i sur. 2007; Hinney i sur. 2007).

1.4. Gen *FTO*

Gen *FTO* prvi je lokus za kojeg je cjelogenomskom asocijacijskom studijom (eng. *genome-wide associated study,* GWAS) jasno utvrđena povezanost s pretilošću. To su istraživanje proveli Frayling i suradnici 2007. godine kako bi pronašli poveznicu između polimorfizama duž čitavog ljudskog genoma i dijabetesa tipa 2. Na 16. kromosomu u prvom intronu gena *FTO* pronašli su polimorfizam rs9939609 koji je pokazivao jaku povezanost s dijabetesom tipa 2 i povećanim BMI-om, ali nakon podešavanja za BMI ta očita povezanost ovog polimorfizma i dijabetesa tipa 2 nije očuvana. To navodi na zaključak da je povezanost ovog gena i dijabetesa tipa 2 posredovana efektom gena *FTO* na BMI (Frayling i sur. 2007).

Do sada je poznato da je gen *FTO* jako veliki gen. Ima 9 eksona i proteže se na više od 400 kilobaza na položaju u kromosomu 16q12.2 (Loos i Yeo 2014). Kodira za demetilazu nukleinske kiseline ovisnu o Fe(II) i 2-oksoglutaratu (Gerken i sur. 2007), no još se ne zna ni točna fiziološka funkcija ni njegova uloga u razvoju pretilosti (Han i sur. 2010; Fawcett i

Barroso 2010). U bliskoj je srodnosti s DNA demetilazom AlkB u bakterija i homolozima AlkB 1 i 2 u sisavaca ABH1 i ABH2 (Gerken i sur. 2007). Prema dosadašnjim rezultatima eksperimenata moguće je da protein FTO sudjeluje u regulaciji gena na RNA razini katalizirajući demetilaciju 3-metiltimina u jednolančanoj DNA, 3-metiluracila u RNA i N6-metiladenozina u RNA u jezgri, (Gerken i sur. 2007; Scuteri i sur. 2007; Sanchez-Pulido i Andrade-Navarro 2007; Han i sur. 2010; Fawcett i Barroso 2010; Jia i sur. 2008; Jia i sur. 2011). Otkriveno je da je gen *FTO* i transkripcijski koaktivator (Wu i sur. 2010), a moguće je da regulira i duljinu telomera (Dlouha i sur. 2012). Jedna studija je pokazala da varijante gena *FTO* koje su povezane s BMI-om interreagiraju s promotorskom regijom gena *IRX3* (eng. *Iroquois homeobox 3*) u genomima ljudi, miševa i zebrica. Pokazano je i da Irx3-deficijentni miševi imaju 25-30% manju tjelesnu masu (Smemo i sur. 2014). Ova studija navodi na zaključak da je gen *IRX3* funkcionalna dugoročna meta polimorfizama gena *FTO* koji su povezani s pretilošću (Albuquerque i sur. 2015).

Zasad se gen *FTO* ističe kao najjači i najznačajniji genetički doprinositelj poligenskoj pretilosti. (Speliotes i sur. 2010; Larder i sur. 2011). Iako polimorfizmi jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP) u genu *FTO* ne utječu na porođajnu težinu (Rzehak i sur. 2010; Cauchi i sur. 2009; Jess i sur. 2008; Kilpelainen i sur. 2011; Horikoshi i sur. 2013), njihov utjecaj vidljiv je od treće 3. godine života. Nakon toga se njihov utjecaj povećava do mladog odraslog doba, kada doseže maksimum te opada tijekom odraslog doba. (Graff i sur. 2013; Hardy i sur. 2010; Rzehak i sur. 2010; Cauchi i sur. 2009; Jess i sur. 2008; Jia i sur. 2011; Qi i sur. 2008; Sovio i sur. 2011).

Gen *FTO* je eksprimiran u jezgrama gotovo svih vrsta tkiva čovjeka (Dina i sur. 2007), ali najveću ekspresiju pokazuje u dijelu mozga koji je glavni u kontroliranju energetske homeostaze i ponašanja u hranjenju, a to je arkuatna jezgra hipotalamusa (Frayling i sur. 2007). Istraživanja na miševima, štakorima i ljudima pokazuju da je ekspresija mRNA gena *FTO* regulirana unosom hrane (Gerken i sur. 2007; Fredriksson i sur. 2008; Stratigopoulos i sur. 2008; Tung i sur. 2010), razinom glukoze u krvi (Poritsanos i sur. 2011), tjelesnom masom (Wahlen i sur. 2008; Zabena i sur. 2009) i potrošnjom energije (Stratigopoulos i sur 2008; Fischer i sur. 2009). Čini se da varijante gena *FTO* vode k povećanom unosu energije (Speakman i sur. 2008) modificirajući hipotalamičnu kontrolu apetita (Jacobsson i sur. 2012). Isključivanje (knockdown) ekspresije gena *FTO* dovodi do povećanja koncentracije ATP-a u neuronima, ali i smanjenja u adipocitima što nagovještava kontroliranje proizvodnje energije specifično za stanicu (Pitman i sur. 2012).

1.4.1 Gen *FTO* i komorbiditeti povezani s pretilošću

Polimorfizmi jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP) gena *FTO* povezani su s nizom kardiometaboličkih osobina što i ne čudi s obzirom da postoji jaka veza gena *FTO* i BMI-a, a pretilost je važan rizični faktor za kardiovaskularne i metaboličke bolesti (Speliotes i sur. 2010; Frayling i sur. 2007; Fall i sur. 2013). U 36 istraživanja na ukupno 198 502 ispitanika ispitivan je učinak polimorfizama gena FTO na 24 kardiometaboličke osobine i pokazano je da polimorfizmi gena *FTO* koji povećavaju BMI su također povezani s povećanim rizikom obolijevanja od dijabetesa tipa 2, zastoja srca, koronarnih bolesti srca, hipertenzije, metaboličkog sindroma, dislipidemije, povećanim rizikom od smrtnosti, povećanom razinom glukoze nakon gladovanja te nakon 2 sata oralnog testa tolerancije na glukozu, povećanom razinom inzulina, glikoziliranog hemoglobina A1C, razinom lipida, jetrenih enzima i upalnih markera. Većina ovih kardiometaboličkih osobina u potpunosti je posredovana efektom gena *FTO* na BMI. Međutim postoje dokazi da gen *FTO* može, barem djelomično, povećati rizik od dijabetesa tipa 2 neovisno o njegovom učinku na BMI (Fall i sur. 2013).

Zbog toga što pretilost nosi sa sobom i rizik od malignih bolesti provedena su istraživanja o vezi raka i SNP-a gena *FTO* koji su povezani s BMI-om, a dobiveni rezultati su bili različiti. U nekim studijama je pronađena ta povezanost (Brennan i sur. 2009; Delahanty i sur. 2011; Machiela i sur. 2012; Lurie i sur. 2011; Long i sur. 2013; Pierce i sur. 2011; Lewis i sur. 2010), a u nekima ta povezanost nije potvrđena (Gaudet i sur. 2010; Lim i sur. 2012; Li i sur. 2012; Zheng i sur. 2013). No ono što je zanimljivo je da su nedavnim GWAS analizama pronađeni polimorfizmi u drugom i osmom intronu koji pokazuju snažnu vezu s rizikom od melanoma (Iles i sur. 2013) i rakom dojke negativnim za estrogenski receptor (Garcia-Closas i sur. 2013). Ova dva lokusa su neovisna i jedan o drugome i o SNP-ovima gena *FTO* u prvom intronu koji su povezani s BMI-om, a povezanost s rizikom od raka nije posredovana efektom na BMI što daje naslutiti da funkcija gena *FTO* premašuje regulaciju tjelesne mase (Garcia-Closas i sur. 2013; Iles i sur. 2013).

1.4.2 Polimorfizmi gena *FTO*

Do sada je napravljeno preko 500 studija o povezanosti polimorfizama gena *FTO* i pretilosti u nekoliko populacija te je pokazano da je više od 60 polimorfizama u ovom genu značajno povezano s pretilošću (Jacobssoni sur. 2012). Svi ovi polimorfizmi se nalaze u 47 kb velikom bloku neravnoteže vezanosti gena koji obuhvaća dijelove prva dva introna i ekson 2 (Fawcett i Barroso 2010). GWAS-ovima je pokazano da najjaču vezu imaju polimorfizmi rs9939609 (Frayling i sur. 2007), rs9930506 (Scuteri i sur. 2007), rs1421085, rs17817449 i rs1121980 (Dina i sur. 2007), a svi ovi polimorfizmi se nalaze u prvom intronu, ali njihov fiziološki učinak koji doprinosi razvoju pretilosti je još uvijek nepoznat (Frayling i Ong 2011).

Karns R. i suradnici (2011) su proveli studiju o povezanosti 22 SNP-a u 10 različitih gena za koje je prijašnjim GWAS-ovima ustanovljena njihova veza sa pretilošću i dijabetesom tipa 2 (*INSIG2, PPARG, CDKAL1, SLC3OA8, CDKN2B, CDKN2A, HHEX/IDE, TCF7L2, FTO* i *MC4R*) i 18 antropoloških i biokemijskih osobina. Ono što je nama značajno za tu studiju je da su svi ispitanici bili stanovnici Hvara, 360 muškaraca i 483 žene. Svih 8 ispitivanih SNP-ova u genu *FTO* (rs9939973, rs1421085, rs1121980, rs17817449, rs8050136, rs3751812, rs9939609 i rs7190492) pokazali su značajnu povezanost s tjelesnom masom, BMI-om, opsegom struka i opsegom kukova.

1.4.3 Polimorfizam rs9939609

Polimorfizam rs9939609 gena *FTO* posebno je zanimljiv jer pokazuje najveći znani efekt na povećanje BMI-a (Frayling i sur. 2007). Neovisna istraživanja na bijelcima potvrdila su njegovu vezu s povećanim BMI-om i fenotipovima koji se pojavljuju s pretilošću (Jonsson i sur. 2009; Gonzalez-Sanchez i sur. 2009). Istraživanje provedeno na 843 stanovnika otoka Hvara također je potvrdilo njegovu povezanost s BMI-om, masom, opsegom struka, opsegom kukova i razinom HDL-a (Zhang i sur. 2010). Hallman i sur. (2012) su analizirajući djecu i adolescente (8-18 godina) otkrili značajnu interakciju genotipa i godina te pretpostavljaju da će osobe genotipa AA sa 8 godina imati BMI veći za 0,7 kg/m^2 , a sa 17 godina BMI veći za 1,6 kg/m^2 od osoba genotipa AT ili TT. Istraživanje je pokazalo da, neovisno o BMI-u, nosioci A alela imaju veću koncentraciju cirkulirajućeg C-reaktivnog proteina (Fisher i sur. 2009). Rizični alel A povećava rizik od dijabetesa tipa 2 (Binh i sur. 2013).

1.5 Mikrobiom usne šupljine

Provedena su mnoga istraživanja na mikrobiomu crijeva pretilih osoba i osoba normalne mase. Rezultati pokazuju da pretile osobe u crijevima imaju više bakterija iz koljena *Firmicutes* i relativno manje bakterija iz koljena *Bacteroidetes* u usporedbi s osobama normalne tjelesne mase (Tsai i Coyle 2009). Pokazano je da prehrana ima veliki utjecaj na sastav mikrobioma crijeva. U studiji u kojoj su pretile osobe bile podvrgnute dijeti ograničenoj unosom masti ili nisko kalorijskoj dijeti ograničenoj unosom ugljikohidrata zabilježeno je smanjenje broja bakterija iz koljena *Firmicutes* i povećanje bakterija iz koljena *Bacteroidetes.* (Ley i sur. 2006). Još se ne zna postoji li veza pretilosti i mikroorganizama usne šupljine.

Goodson i suradnici (2009) su analizirali udio 40 vrsta bakterija u slini 313 osoba veće tjelesne mase (BMI 27-32 kg/m^2) i 232 osobe normalne mase. U sedam bakterijskih vrsta medijan udjela bakterija u ukupnom broju bakterija u slini u osoba veće tjelesne mase je bio za najmanje 2% veći od medijana u osoba normalne mase. Te bakterijske vrste su: *Selenomonas noxia, Actinomyces gerencseriae, Actinomyces naeslundii, Neisseria mucosa, Fusobacteria periodonticum, Fusobacteria nucleatum ss vincentii* i *Prevotella melaninogenica*. Zanimljivo je da su gotovo sve bakterijske vrste iz koljena *Firmicutes,* osim Eubacterium sp. i *G. morbillorum*, imale veći medijan udjela u osoba veće tjelesne mase.

Zanimljivo je i da 98.4% osoba veće tjelesne mase imalo udio bakterije *S.noxia* veći od 1,5%, a u 80,2% osoba normalne mase taj je udio bio manji od 1,5% što bi moglo imati i dijagnostičku primjenu, ali i ulogu u pretilosti (Goodson i sur. 2009).

Analizirajući bris nosa, Olsen i sur. (2013) su ustanovili da postoji pozitivna korelacija BMI-a i kolonizacije nosa bakterijom *S. aureus* među mlađim i premenopauznim ženama. Za svako povećanje BMI-a za 2,5 kg/m^2 opaženo je povećanje izgleda kolonizacije bakterijom S. aureus za 7 % (Olsen i sur. 2013).

1.6 Životne navike, bolesti i pretilost

Provedena su brojna istraživanja o životnim navikama i bolestima osoba normalnog BMI-a i pretilih osoba.

Istraživanje je pokazalo da povećan broj obroka ne potiče mršavljenje više nego manji broj obroka, ukoliko se radi o podjednakom broju unesenih kalorija na dan. Konkretno, ovaj zaključak je izveden iz usporedbe 3 obroka i 6 obroka dnevno, 3 obroka i 3 užine (Cameron i sur. 2010).

Rautiainen i sur. (2016) su zaključili da bi veća konzumacija mliječnih proizvoda mogla biti važna u prevenciji debljanja u srednje starih i starijih žena koje su inicijalno normalne mase.

Studija provedena na Kanađanima o povezanosti doručkovanja i BMI-a pokazala je da niti konzumacija doručka naspram nekonzumacija doručka, niti vrsta doručka (eng. „ready-to-eat cereal„ ili neki drugi doručak) nije dosljedno povezana s povećanim BMI-om (Barr i sur. 2016).

Zna se da pretilost povećava rizik od hipertenzije (Huang i sur. 1998).

Jedna studija kaže da postoji povezanost unosa soli i krvnog tlaka (Elliott 1991).

Što se tiče pušenja i BMI-a, neke studije nisu našle značajnu povezanost (Zbikowski i sur. 2011), neke su predložile da bi pušenje moglo biti povezano s nižim BMI-om (Klesges i sur. 1989), a prestanak pušenja s povećanim BMI-om (Munafo i sur. 2009).

Pokazano je da je duljina noćnog sna povezana s BMI-om. Procjenjuje se da smanjenje noćnog sna za 1 sat povećava BMI za 2% (Rontoyanni i sur. 2007)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su utvrditi postoje li razlike između žena Zagrebačke županije normalnog BMI-a i pretilih žena Zagrebačke županije u:

1. genetskoj podlozi (s obzirom na polimorfizam rs9939609 gena *FTO*)
2. sastavu mikroorganizama u usnoj šupljini
3. bolestima te životnim navikama

4. Ustanoviti postoji li povezanost genotipova polimorfizma rs9939609 gena *FTO* i životnih navika i oboljenja ispitanica.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici

U ovom istraživanju sudjelovalo je 66 žena: 46 žena s BMI-om većim od 30 kg/m^2 i 20 žena s BMI-om između 18,5 kg/m^2 i 25 kg/m^2 kao kontrolna skupina. Svaka ispitanica je dobrovoljno pristala sudjelovati u istraživanju i upoznata je s ciljevima istraživanja te je svaka ispitanica potpisala informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Ispitanice su ispunile anketu, isprale usta s 13 ml 0,9%-tne fiziološke otopine pa dale 2 ml sline, a uzeto im je i 2 ml krvi.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2 Određivanje genotipa rs9939609 gena *FTO*

3.2.1 Izolacija DNA iz krvi

Ispitanicama je u Kliničko bolničkom centru Zagreb - Rebro uzeto 2 ml pune krvi i pohranjeno na -20 °C u epruvetama s antikoagulansom EDTA (Etilendiamintetraoctena kiselina).

Genomska DNA je izolirana pomoću kompleta DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) prema uputama proizvođača. U Eppendorf tubicu od 1,5 ml stavljeno je 20 µl proteinaze K, 100 µl krvi, 4 µl Rnase A i 96 µl pufera PBS (sastava prema Tablici 1, pH 7,2), a potom je ta otopina inkubirana dvije minute na sobnoj temperaturi. Dodano je 200 µl pufera za lizu AL*, snažno vorteksirano (tehtnica železniki EV -202) i inkubirano u termobloku (PHMT) 10 minuta na 56 °C. Dodano je 200 µl 96%-tnog etanola, vorteksirano te je otopina prebačena u DNeasy Mini spin kolonicu koja je stavljena u 2 ml kolekcijske tubice. Centrifugirano (miniSpin, Eppendorf) je 1 minutu na 8000 okretaja min^{-1}. Kolekcijska tubica skupa s tekućinom koja je prošla kroz kolumnu je bačena, a kolonica je prebačena u novu kolekcijsku tubice. Dodano je 500 µl pufera za ispiranje AW1*, centrifugirano 1 minutu na 8000 okretaja min^{-1}. Kolekcijska tubica skupa s tekućinom koja je prošla kroz kolonicu je bačena, a kolonica je stavljena u novu kolekcijsku tubicu, dodano 500 µl pufera za ispiranje AW2*, centifugirano 5 minuta na 18300 x g. Kolekcijska tubica skupa s tekućinom koja je prošla kroz kolonicu je bačena, a kolonica je prebačena u Eppendorf tubicu, dodano je 200 µl pufera za eluciju AE* i nakon inkubacije od 1 minute na sobnoj temperaturi centrifugirano je 1 minutu na 8000 okretaja min^{-1}. Kolonica je bačena, a u eluatu je bila DNA koja je prije pohrane podvrgnuta daljnjoj analizi.

* sastav pufera je zaštićen od strane proizvođača (QIAGEN GmbH, QIAGEN Str. 1, 40724 Hilden, Germany)

Koncentracija i kvaliteta izolirane DNA izmjerena je spektrofotometrijski (NanoPhotometer® N60, IMPLEN), a zatim je 3 µl eluata DNA pomiješano s 1 kb markerom (BioLabs) te je ta otopina analizirana na 1% agaroznom gelu (0,5 g agaroze, SIGMA, 50 ml 1X TAE pufera (Tris-acetate-EDTA sastava prikazanog u Tablici 2.), 2,25 µl etidijevog bromida koncentracije 10 mg ml^{-1}) 35 minuta na 80 V na aparatu za elektroforezu (Electrophoresis Power Supply EPS 601, Amersham Biosciences).

Izolirana DNA je pohranjena na -20 °C.

Tablica 1. Sastav fosfatnog pufera (PBS)

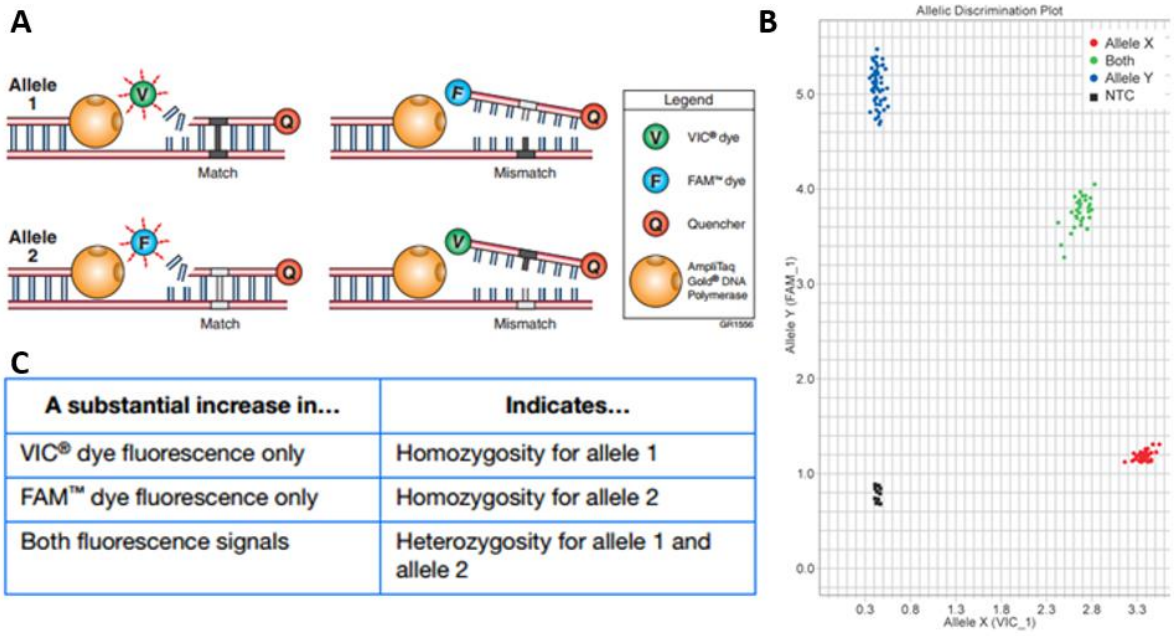
Tvar	**Količina**
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na_2HPO_4 x $2H_20$	1,15 g
K_2HPO_4	0,2 g
destilirana voda	do 1000 ml

Tablica 2. Sastav 50X TAE pufera

Tvar	**količina**
Tris baza (SIGMA)	242 g
Octena kiselina	57,1 ml
Prah kompleksa III (Kemika)	18,6 g
Voda	do 1000 ml

3.2.2 Određivanje genotipa metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

Za određivanje baze T ili A na mjestu polimorfizma rs9939609 korištena je lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (eng. *Real-time PCR*) i metoda alelne diskriminacije polimorfizma s mješavinom *TaqMan™* (eng. *TaqMan SNP Genotyping assay*) C_30090620_10 koji se sastoji od dvije probe obilježene flouroscentnim bojama (alel A obilježen bojom VIC, a alel T obilježen bojom FAM) i 2 specifične početnice (1 par). Svaka proba osim jedne fluorescentne boje na 5' kraju ima na sebi i neflourescencijski prigušivač (eng. *nonflourescent quencher*, NFQ) koji virtualno eliminira pozadinsku fluorescenciju te MGB (eng. *Minor Groove Binder*) koji stabilizira kompleks kalupa i probe. Ova *TaqMan™ real-time PCR* metoda se temelji na hibridizaciji ciljnog slijeda i one probe koja je komplementarna slijedu tog alela. AmpliTaq Gold® DNA polimeraza umnaža ciljnu DNA sekvencu pomoću specifične početnice, a njena 5' nukleazna aktivnost dovodi do cijepanja probe što uzrokuje odvajanje fluorofora od prigušivača i detekcije fluorescentnog signala (Slika 3. A). Ukoliko je signal posljedica cijepanja probe obilježene bojom VIC onda se radi o homozigotu za alel A. Ukoliko je signal posljedica cijepanja probe obilježene bojom FAM onda se radi o homozigotu za alel T, a ukoliko su detektirana oba signala onda se radi o heterozigotu (Slika 3.C). Ti signali su prikazani grafički kao na Slici 3.B



C

A substantial increase in...	Indicates...
VIC® dye fluorescence only	Homozygosity for allele 1
FAM™ dye fluorescence only	Homozygosity for allele 2
Both fluorescence signals	Heterozygosity for allele 1 and allele 2

Slika 3. Princip (A), rezultat (B) i značenje rezultata (C) genotipizacija SNP-a metodom *real-time PCR* s mješavinom *TaqMan™* (www.dnalink.com)

Za genotipizaciju je prvo potrebno podesiti koncentraciju DNA tako da u 11,25 µl otopine bude 10 ng DNA tj. koncentracija DNA treba iznositi 0,88 ng μl^{-1}. Kako su to jako niske koncentracije koje nije moguće izmjeriti, dobiveni eluat DNA od 200 µl koncentriran je na otprilike 50 µl (SpeedVac Concentrator, Thermo Electron Corporation), potom je izmjerena koncentracija DNA i razrijeđena na 7, 14 ili 42 ng μl^{-1} te tri puta izmjerena koncentracija i

izračunata srednja vrijednost. Takav koncentrirani eluat DNA iskorišten je za pripremu 70 ml otopine DNA i Mili-Q vode koncentracije 0,88 ng μl^{-1}.

40 X *TaqMan™* mješavina je osjetljiva na svjetlo te je zbog toga, a i zbog smanjivanja broja ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja, razrijeđena sa 1 X TE puferom (QIAGEN) na 20 X radnu koncentraciju, vorteksirana, centrifugirana, alikvotirana, zamotana u aluminijsku foliju i pospremljena u mrak na - 20 °C.

Za samu reakciju PCR u stvarnom vremenu u optičku tubicu je otpipetirano 11,25 µl otopine DNA koncentracije 0,88 ng μ^{-1}, 12,5 µl 2X TaqMan® Master Mix-a (Applied Biosystem) i 1,25 µl 20X SNP Genotyping Assay-a (Applied Biosystem). Sadržaj u optičkoj tubici se promiješao uvlačenjem u mikropipetu, začepio se poklopcem te kratko centrifugirao kako bi nestali mjehurići. Bitno je ne dirati donji dio optičke tubice jer kroz nju prolazi svjetlost. Tako pripremljene optičke tubice stavljene su u uređaj 7300 *real-time* PCR system (Applied Biosystem) te su namješteni uvjeti PCR reakcije (Tablica 3.).

Za obradu rezultata korišten je program 7300 System SDS Software 1.4 .

Tablica 3. Uvjeti reakcije PCR

Korak	**Temperatura**	**Vrijeme**	**Broj ciklusa**
Aktivacija enzima	95°C	10 minuta	1
denaturacija	95°C	15 sekundi	40
hibridizacija početnica/ produljivanje DNA	60°C	1 minuta	

3.3. Identifikacija mikroorganizama

3.3.1. Hranjive podloge

Korištene su kompletne podloge MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) i LB (Luria-Bertani).

Kompletna LB podloga pogodna je za uzgoj enterobakterija, a kompletna MRS za uzgoj bakterija mliječne kiseline.

Krute MRS podloge napravljene su miješanjem 42,14 g MRS AGAR WITH TWEEN 80 (Biolife, sastav prikazan u Tablici 4.) i 0,6 L destilirane vode .

Tablica 4. Sastav krute podloge MRS

Tvar	**Količina**
Pepton	10 g
Goveđi ektrakt	10 g
Kvaščev ekstrakt	5 g
Glukoza	20 g
Dikalijev hidrogen fosfat	2 g
Natrijev acetat	5 g
Diamonijev citrat	2 g
Magnezijev sulfat	0,2 g
Manganov sulfat	0,05 g
Agar	15 g
Tween® 80	1 g

Tekuće MRS podloge napravljene su miješanjem 16,56 g MRS BROTH WITH TWEEN 80 (Biolife, sastav isti kao i krute MRS u Tablici 4. samo bez agara) i 0,3 L destilirane vode.

Sastav krutih LB podloga je u prikazan u Tablici 5., a tekuće su istog sastava samo bez dodatka agara.

Tablica 5. Sastav krute podloge LB

Tvar	**količina**
Bacto Tryptone	6 g
Yeast Extract	3 g
NaCl (Carlo Erba reagents)	3 g
Agar	9 g
destilirana voda	0,6 L

Podloge su sterilizirane na 121 °C tijekom 15 minuta, a krute podloge su nakon sterilizacije razlivene u sterilne Petrijeve zdjelice.

3.3.2 Izolacija čistih kultura

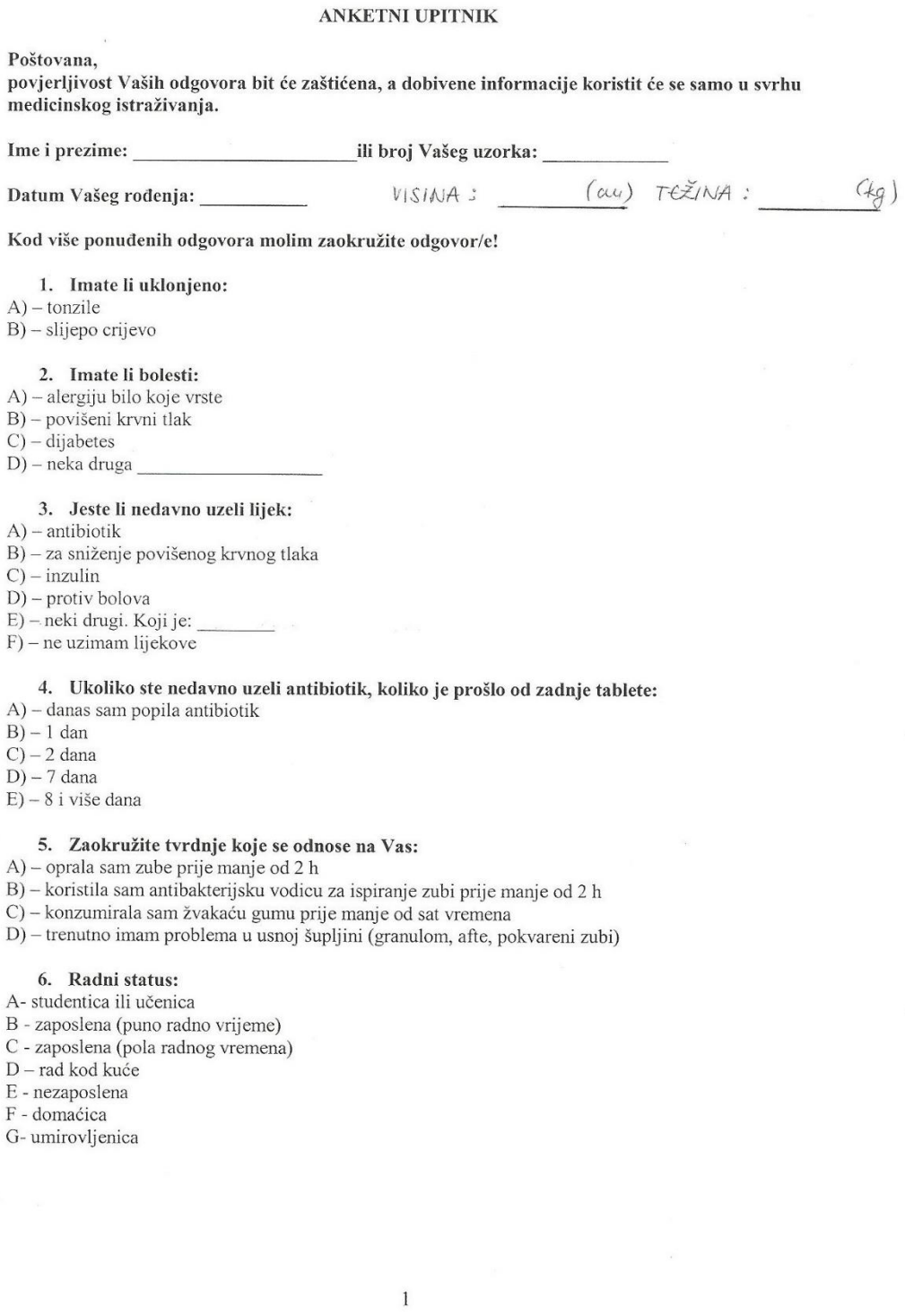
Na krute podloge MRS i LB nacijepljeno je po 0,5 ml nerazrijeđene sline i 0,5 ml sline razrijeđene fosfatnim puferom, pH 7,2 sastava prikazanog u Tablici 1. Ploče su potom inkubirane 2 dana u termostatu (Termo medicinski aparati) na 37 °C. Od poraslih kolonija na svakoj ploči odabrane su fenotipski različite kolonije i nacijepljene na nove podloge (MRS ili LB ovisno na kojoj je podlozi prethodno izrasla) metodom do iscrpljenja te su te ploče stavljene u termostat na 37 °C. S tih ploča s čistim kulturama odabrana je 1 kolonija i precijepljena u epruvetu s 3 ml tekuće podloge (MRS ili LB ovisno na kojoj je podlozi izrasla) i stavljena preko noći u tresilicu (New Brunswick scientific, 100 okreta minuta^{-1}, 37 °C). Sutradan je 24 sata stara kultura centrifugirana (Tehtnica železniki) u Eppendorf tubicu na 4000 okret minuta^{-1}, supernatant je bačen, a na talog je dodano 1 ml 50%-tnog glicerola i pohranjeno na -20 °C. Ploče s čistim kulturama s kojih je uzeta kolonija za tekuću podlogu su poslane na Institut Ruđer Bošković (Zavod za fizičku kemiju, Laboratorij za spektrometriju masa) kako bi se saznalo koje su vrste mikroorganizama izolirane.

3.3.3 Identifikacija mikroorganizama masenom spektrometrijom

Pomoću uređaja MALDI Biotyper (Bruker Daltonik) identificirani su izolirani sojevi mikroorganizama. Identifikacija se temelji na MALDI-TOF (eng. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*) masenoj spekrometriji koja mjeri najzastupljenije proteine u mikroorganizmima, a rezultat je spektar koji se uspoređuje sa spektrima tipičnim za određeni soj iz baze podataka (https://www.bruker.coml).

3.4 Anketa

Kako bi dobili informacije o BMI-u, starosti, životnim navikama i oboljenjima, ispitanice su ispunile anketu prikazanu na Slici 4.



ANKETNI UPITNIK

Poštovana,
povjerljivost Vaših odgovora bit će zaštićena, a dobivene informacije koristit će se samo u svrhu medicinskog istraživanja.

Ime i prezime: _____ **ili broj Vašeg uzorka:** _____

Datum Vašeg rođenja: _____ VISINA : _____ (cm) TEŽINA : _____ (kg)

Kod više ponuđenih odgovora molim zaokružite odgovor/e!

1. **Imate li uklonjeno:**

A) – tonzile
B) – slijepo crijevo

2. **Imate li bolesti:**

A) – alergiju bilo koje vrste
B) – povišeni krvni tlak
C) – dijabetes
D) – neka druga _____

3. **Jeste li nedavno uzeli lijek:**

A) – antibiotik
B) – za sniženje povišenog krvnog tlaka
C) – inzulin
D) – protiv bolova
E) – neki drugi. Koji je: _____
F) – ne uzimam lijekove

4. **Ukoliko ste nedavno uzeli antibiotik, koliko je prošlo od zadnje tablete:**

A) – danas sam popila antibiotik
B) – 1 dan
C) – 2 dana
D) – 7 dana
E) – 8 i više dana

5. **Zaokružite tvrdnje koje se odnose na Vas:**

A) – oprala sam zube prije manje od 2 h
B) – koristila sam antibakterijsku vodicu za ispiranje zubi prije manje od 2 h
C) – konzumirala sam žvakaću gumu prije manje od sat vremena
D) – trenutno imam problema u usnoj šupljini (granulom, afte, pokvareni zubi)

6. **Radni status:**

A- studentica ili učenica
B - zaposlena (puno radno vrijeme)
C - zaposlena (pola radnog vremena)
D – rad kod kuće
E - nezaposlena
F - domaćica
G- umirovljenica

1

Slika 4. Anketa o indeksu tjelesne mase, starosti, životnim navikama i oboljenjima ispitanica

7. Koliko uobičajeno imate dnevnih obroka?

A - jedan
B - dva
C - tri
D - četiri
E – pet ili više

8. Doručkujete li:

A - ne
B - da, neredovito
C - da, redovito

9. Moja svakodnevna prehrana je:

A – uravnotežena i raznolika
B – bogata mesom i mesnim prerađevinama
C – bogata slatkišima i grickalicama
D – svakodnevno pojedem barem 1 mliječni proizvod
E – vegetarijanska

10. Dodajete li sol svom obroku za stolom?

A - nikada
B - kad jelo nije dovoljno slano
C - skoro uvijek prije nego što probam

11. Podaci o pušenju:

A- pušač
B- povremeni pušač
C- bivši pušač
D- nepušač

12. Unazad 7 dana, koliko ste prosječno dnevno proveli vremena sjedeći?

A – manje od 1 sata
C – 3 do 4 sata
D - 8 sati
E – više od 8 sati

13. Unazad 7 dana, koliko ste prosječno dnevno proveli vremena hodajući ili neka druga tjelovježba?

A – manje od 20 minuta
C – 1 sat
D - 2 sata
E – više od 2 sata

14. Unazad 7 dana, koliko ste prosječno dnevno proveli vremena spavajući?

A – manje od 6 sati
B – 6 do 7 sati
C – 8 sati
D - više od 8 sati

Ovo je kraj upitnika, hvala na sudjelovanju.
Najljepše zahvaljujemo na Vašem vremenu.

Datum ispunjavanja ankete: _____

2

Slika 4. Nastavak ankete o indeksu tjelesne mase, starosti, životnim navikama i oboljenjima ispitanica

3.5 Statistička obrada podataka

Za statističku obradu rezultata anketa i identifikacije bakterijskih kultura korišten je Fischerov egzaktni test (http://graphpad.com) i Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SAD), a statistički značajnim smatrane se vrijednosti p manje od 0,05.

Učestalost pojedinog alela i genotipa u osoba normalnog BMI-a i pretilih osoba te značajnost odstupanja distribucije genotipova od očekivane (Hardy-Weinbergova distribucija) je određena X^2-testom pomoću računalnih programa (http://www.oege.org, http://www.had2know.com).

4. REZULTATI

Ovo istraživanje o povezanosti polimorfizma rs99396069 gena *FTO* s tjelesnom masom i mikrobiobom usne šupljine obuhvaća analizu anketa ispitanica, genotipizaciju polimorfizma rs9939609 gena *FTO* te identifikaciju mikroorganizama u slini.

4.1. Rezultati ankete

U istraživanje je uključeno ukupno 66 ispitanica: 20 žena s BMI-om između 18,5 kg/m^2 i 25 kg/m^2 kao kontrolna skupina te 46 pretilih žena odnosno žena s BMI-om većim od 30 kg/m^2.

U tablicama su prikazani rezultati ankete tj. osnovni podaci i podaci o navikama (Tablica 6.) i oboljenjima (Tablica 7.) ispitanica uključenih u istraživanje.

Tablica 6. Informacije o ispitanicama dobivene anketom

	kontrola	%	**pretile**	%
broj ispitanica	20		**46**	
broj godina	33,25 ± 9,7		43,63 ± 9,09	
BMI	21,81 ± 1,69		43,05 ± 6,46	
uklonjene tonzile	9	45,0%	7	15,6%
uklonjeno slijepo crijevo	2	10,0%	2	4,4%
uklonjenje tonzile i slijepo crijevo	0	0,0%	3	6,7%
ništa nije uklonjeno	9	45,0%	34	75,6%
broj obroka u danu				
1	0	0,0%	1	2,3%
2	2	10,0%	10	22,7%
3	12	60,0%	14	31,8%
4	4	20,0%	5	11,4%
5	2	10,0%	1	2,3%
doručak				
ne doručkuje	0	0,0%	7	15,9%
doručkuje neredovito	7	36,8%	15	34,1%
doručkuje redovito	12	63,2%	22	50,0%
svakodnevna prehrana				
uravnotežena i raznolika	15	75,0%	17	38,6%
bogata mesom i mesnim prerađevinama	3	15,0%	23	52,3%
bogata slatkišima i grickalicama	1	5,0%	15	34,1%
svakodnevno pojedem barem 1 mliječni proizvod	8	40,0%	17	38,6%
vegetarijanska	0	0,0%	1	2,3%

	kontrola	%	pretile	%
dodavanje soli				
nikad ne dodaju sol obroku za stolom	5	25,0%	12	27,3%
dodaju sol za stolom kad jelo nije dovoljno slano	13	65,0%	28	63,6%
dodaju sol skorko uvijek prije nego probaju	2	10,0%	4	9,1%
pušenje				
pušač	3	15,0%	10	22,7%
povremeni pušač	3	15,0%	3	6,8%
bivši pušač	1	5,0%	6	13,6%
nepušač	13	65,0%	23	52,3%
vrijeme provedeno sjedeći na dan				
< 1 sat	0	0,0%	6	13,6%
2 sata	4	20,0%	15	34,1%
3 - 4 sata	8	40,0%	7	15,9%
8 sati	8	40,0%	14	31,8%
> 8 sati	0	0,0%	0	0,0%
vrijeme provedeno hodajući ili neka druga tjelovježba na dan				
< 20 minuta	1	5,0%	12	27,3%
1 sat	8	40,0%	13	29,5%
2 sata	3	15,0%	6	13,6%
> 2 sata	8	40,0%	13	29,5%
vrijeme provedeno spavajući na dan				
< 6 sati	0	0,0%	10	22,7%
6 - 7 sati	11	55,0%	16	36,4%
8 sati	6	30,0%	14	31,8%
> 8 sati	3	15,0%	4	9,1%
radni status				
studentica ili učenica	10	50,0%	1	2,2%
zaposlena (puno radno vrijeme)	10	50,0%	26	57,8%
zaposlena (pola radnog vremena)	0	0,0%	1	2,2%
rad kod kuće	0	0,0%	2	4,4%
nezaposlena	0	0,0%	5	11,1%
domaćica	0	0,0%	4	8,9%
umirovljenica	0	0,0%	4	8,9%

Tablica 7. Zdravstveno stanje ispitanica

KONTROLA	alergija		povišen krvni tlak		dijabetes		neka druga	
	kontrola	pretile	kontrola	pretile	kontrola	pretile	kontrola	pretile
alergija	15%	15,6%	0%	2,2%	0%	0%	0%	4,4%
povišen krvni tlak	0%	2,2%	0%	24,4%	0%	15,6%	5%	6,7%
dijabetes	0%	0%	0%	15,6%	0%	2,2%	0%	0%
neka druga	0%	4,4%	5%	6,7%	0%	0%	15%	8,9%
ukupno	**15%**	**22,2%**	**5%**	**48,9%**	**0%**	**17,8%**	**20%**	**20%**
nema bolesti	**65%**	**22,2%**						

Iako su odgovori žena normalnog BMI-a i pretilih uglavnom slični, nađene su statistički značajne razlike.

Statistički značajna razlika utvrđena je u svakodnevnoj prehrani žena normalne težine i pretilih žena. Svoju svakodnevnu prehranu 75% žena iz kontrolne skupine te 38,6% pretilih žena smatra uravnoteženom i raznolikom ($p = 0,0141$). Svoju svakodnevnu prehranu 5% kontrole te 34,1% pretilih ocjenjuje kao bogatom slatkišima i grickalicama ($p = 0,0133$). Svoju svakodnevnu prehranu bogatom mesom i mesnim prerađevinama smatra 15 % kontrole te 52,3% pretilih ($p = 0,006$).

Nema razlike u navikama dodavanja soli u obrok. Nema statistički značajne razlike između pretilih koji ne dodaju stol obroku za stolom i imaju povećan krvni tlak i pretilih koji ne dodaju sol obroku za stolom i nemaju povećan krvni tlak ($p = 1,0000$). Ne postoji ni statistički značajna razlika između pretilih koji imaju povišen krvni tlak i dodaju sol obroku za stolom kad jelo nije dovoljno slano i pretilih koji nemaju povećan krvni tlak i dodaju sol skoro uvijek prije nego probaju ($p = 0,3457$).

Ne doručkuje 15,9% pretilih dok svi u kontrolnoj skupini doručkuju redovito ili neredovito, ali to ipak nije statistički značajno ($p = 0,0882$)

Nema značajne razlike u pušačkim navikama kontrole i pretilih.

Nema značajnih razlika ($p = 0,1644$) u vremenu koje žene iz kontrolne skupine i pretile provedu sjedeći manje od 1 sata, a ni u vremenu koje žene iz kontrolne skupine (40%) i pretile (15,9%) provedu sjedeći 3-4 sata ($p = 0,0603$). Jedna žena normalnog BMI-a, ali 27,3% pretilih provede manje od 20 minuta na dan hodajući ili baveći se nekom drugom tjelesnom aktivnošću ($p = 0,0885$), a za druge kategorije aktivnosti razlika je još i manja.

Što se tiče vremena provedenog spavajući, niti jedna žena normalnog BMI-a ne spava manje od 6 sati dok 22,7% pretilih ima tu naviku ($p = 0,0240$). Više žena normalnog BMI-a spava 6 do 7 sati nego pretile žene ($p = 0,0291$).

Što se tiče zdravstvenog stanja, u pretilih žena češći je visoki krvni tlak ($p = 0,0005$) i manje je pretilih osoba koje nemaju bolesti ($p = 0,0004$). Kada za usporedbu uzmemo od kontrolne skupine samo starije žene ($41,9 \pm 8,52$ godina) tada je visoki krvi tlak također statistički značajno učestaliji u pretilih žena ($p = 0,0335$), ali broj žena iz kontrolne skupine koje nemaju bolesti nije statistički značajno veći od broja pretilih žena bez bolesti ($p = 0,2552$).

Dijabetes ima 17,8 % pretilih, a niti jedna žena iz kontrolne skupine nema dijabetes (p = 0,0510). Još je manja statistička značajnost (p=0,3263) kad se za usporedbu od kontrole uzmu samo starije žene (41,9 ±8,52 godina).
Učestalost dijabetesa u pretilih koji su nositelji genotipa AA za polimorfizam rs9939609 nije statistički značajno veća (p=0,1243).
Učestalost povišenog krvnog tlaka u pretilih nositelja genotipa AA nije veća (p=1,0000).

4.2 Distribucija genotipova polimorfizma rs9939609 u žena iz kontrolne skupine i pretilih žena

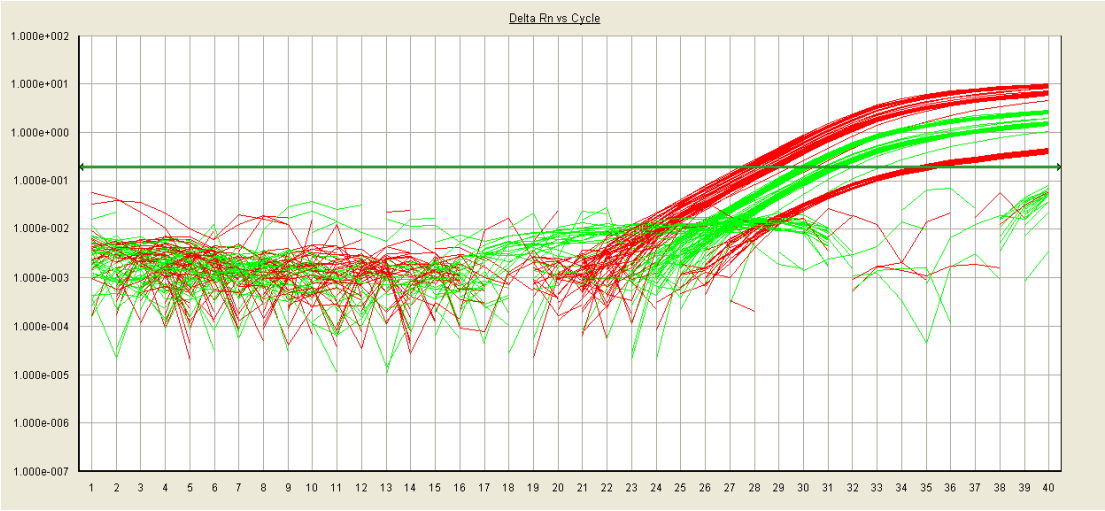
Drugi dio istraživanja obuhvatio je analizu polimorfizma rs9939609 gena *FTO*. Analiza je napravljena metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu s mješavinom *TaqMan™* u kojoj se nalaze obilježene probe za pojedini alel. Na slikama su prikazani primjeri amplifikacijskih krivulja za heterozigot TA (Slika 5.), homozigot TT (Slika 6.), amplifikacijska krivulja svih uzoraka (Slika 7.) te slika grafičkog prikaza alelne diskriminacije (Slika 8.)



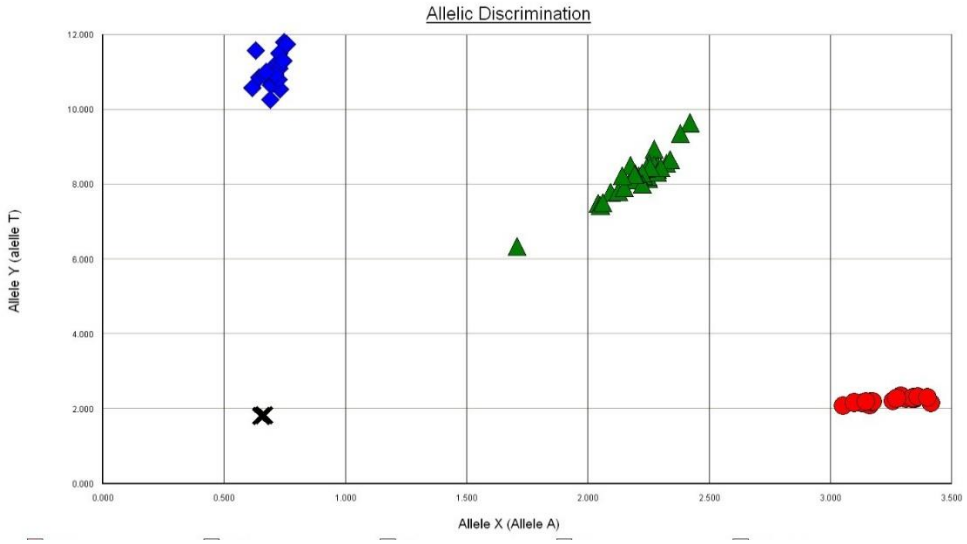
Slika 5. Primjer amplifikacijske krivulje heterozigota TA za polimorfizam rs9939609 gena *FTO* metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu s mješavinom *TaqMan™*



Slika 6. Primjer amplifikacijske krivulje homozigota TT za polimorfizam rs9939609 gena *FTO* metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu s mješavinom *TaqMan™*



Slika 7. Amplifikacijske krivulje svih 65 uzoraka DNA za polimorfizam rs9939609 gena *FTO* metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu s mješavinom *TaqMan™*



Slika 8. Grafički prikaz alelne diskriminacije DNA za polimorfizam rs9939609 gena *FTO* metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu s mješavinom *TaqMan™*. Plavo su označeni homozigoti za alel T, crveno homozigoti za alel A, zeleno su heterozigoti. X je rezultat negativne kontrole.

U Tablici 8. prikazane su frekvencije opaženih i očekivanih genotipova u kontrolnoj skupini i skupini pretilih žena. Dobiveni rezultati u skladu su s Hardy-Weinbergovom ravnotežom. U Tablici 9. prikazane su frekvencije i udio pojedinih genotipova i alela u kontrole i pretilih, a odnos genotipova najjasnije je prikazan grafički (Slika 9.)

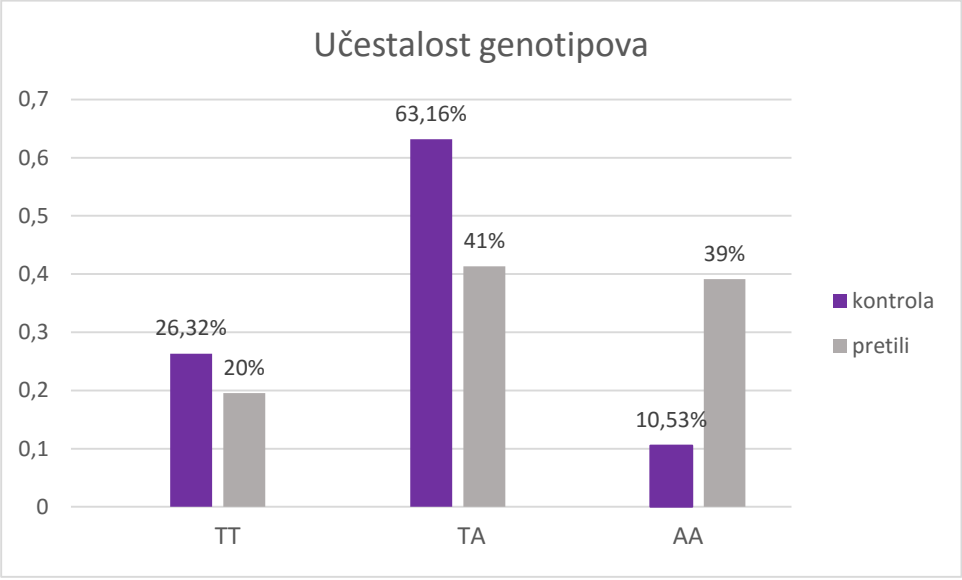
Tablica 8. Raspodjela genotipova TT, TA i AA polimorfizma rs9939609 gena *FTO* te X^2 i p-vrijednost

GENOTIPOVI		**TT**	**TA**	**AA**	
KONTROLA (19 žena)	dobiveno	5	12	2	X^2 = 1,66
	očekivano	6,37	9,26	3,37	p = 0,1978
PRETILI (46 žena)	dobiveno	9	19	18	X^2 = 0,91
	očekivano	7,44	22,12	16,44	p = 0,3388

*****ukoliko je p < 0,05 rezultat nije u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom

Tablica 9. Učestalost genotipova TT, TA i AA te alela T i A za polimorfizam rs9939609 gena *FTO* u kontrolnoj skupini i skupini pretilih žena

	TT	**TA**	**AA**	**T**	**A**
KONTROLA (19 žena)	5 (26,31%)	12 (63,16%)	2 (10,53)	22 (57,89%)	16 (42,11%)
PRETILI (46 žena)	9 (19,57%)	19 (41,30%)	18 (39,13%)	37 (40,22%)	55 (59,78%)



Slika 9. Odnos učestalosti genotipova TT, TA i AA u kontrolnoj skupini i skupini pretilih žena

Fischerov egzaktni test ne pokazuje statistički značajnu razliku u učestalosti genotipa TT (p= 0,5290) ni genotipa TA (0,1717) između kontrolne i pretile skupine, ali pokazuje statistički značajnu razliku u učestalosti genotipa AA (p = 0,0367) između kontrolne skupine i skupine pretilih žena.

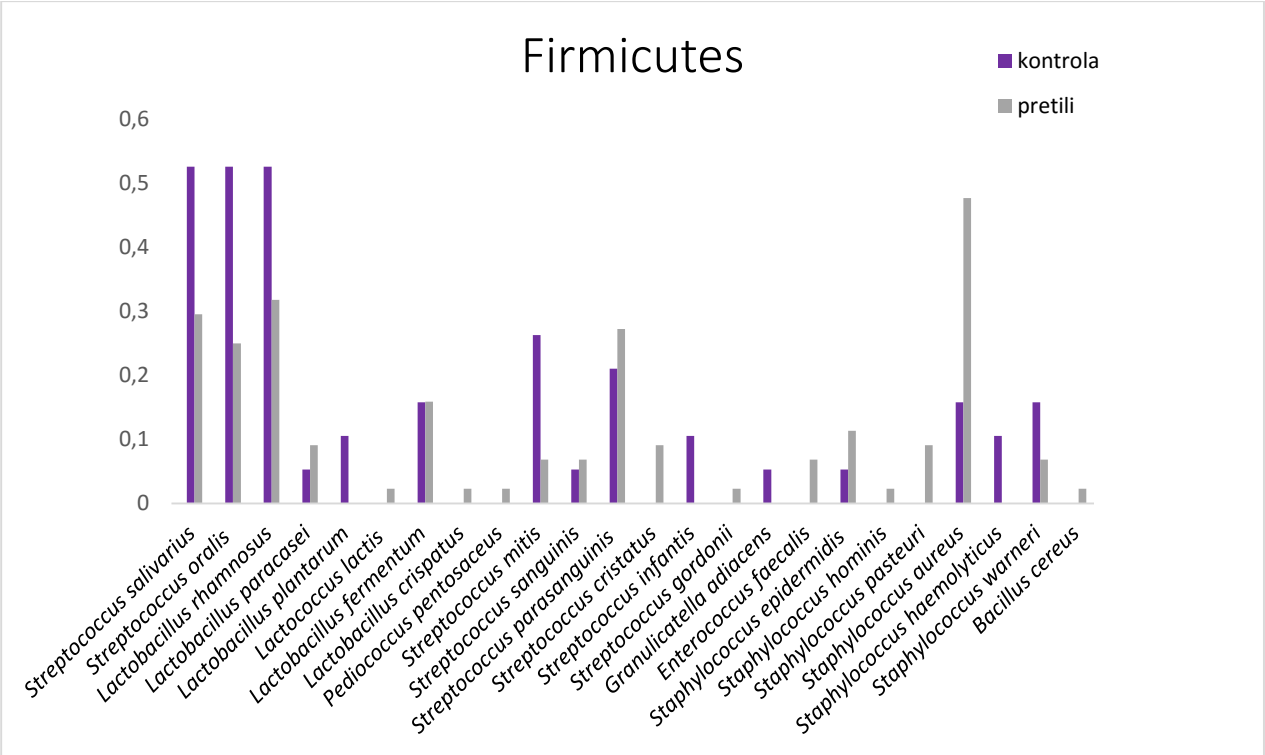
4.3 Raznolikost mikrobioma usne šupljine u žena iz kontrolne skupine i pretilih žena

Uz provedenu anketu i genotipizaciju identificirani su mikroorganizami u usnoj šupljini. Razlike u učestalosti različitih vrsta mikroorganizama u usnoj šupljini (slini) kontrolnih i pretilih osoba prikazana je u Tablici 10., a radi uočljivijih rezultata prikazana je i grafički po koljenima (Slike 10, 11, 12 i 13).

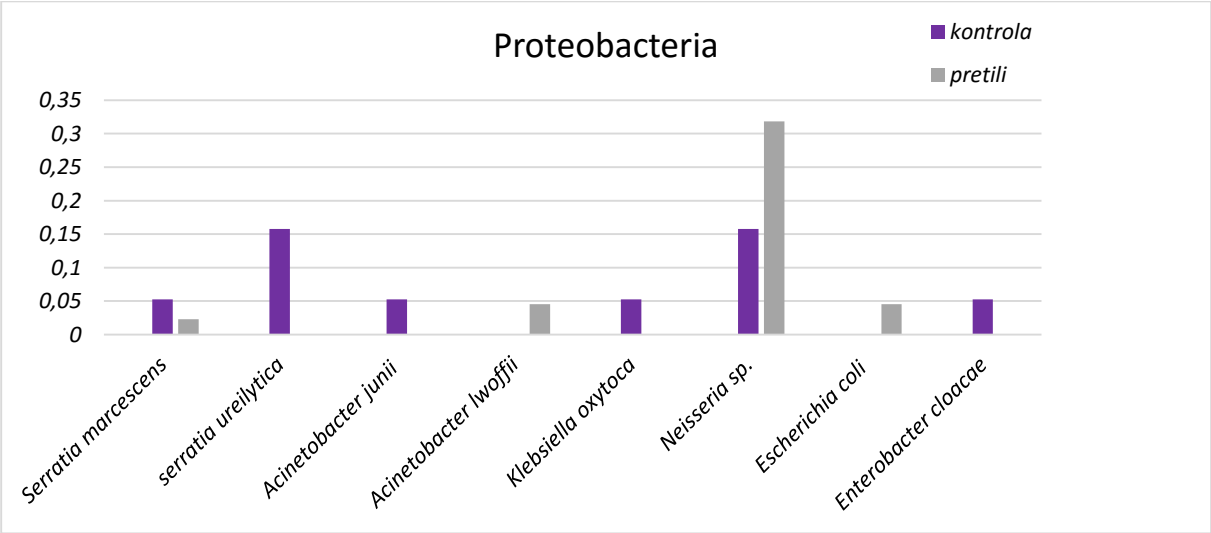
Tablica 10. Udio osoba u kojih je identificirana pojedina vrsta mikroorganizama

Carstvo: Bacteria	kontrola	%	pretile	%
Firmicutes				
Streptococcus salivarius	9	47,37%	13	29,55%
Streptococcus oralis	10	52,63%	11	25,00%
Lactobacillus rhamnosus	9	47,37%	14	31,82%
Lactobacillus paracasei	1	5,26%	4	9,09%
Lactobacillus plantarum	2	10,53%	0	0,00%
Lactococcus lactis	0	0,00%	1	2,27%
Lactobacillus fermentum	3	15,79%	7	15,91%
Lactobacillus crispatus	0	0,00%	1	2,27%
Pediococcus pentosaceus	0	0,00%	1	2,27%
Streptococcus mitis	5	26,32%	3	6,82%
Streptococcus sanguinis	1	5,26%	3	6,82%
Streptococcus parasanguinis	3	15,79%	12	27,27%
Streptococcus cristatus	0	0,00%	4	9,09%
Streptococcus infantis	2	10,53%	0	0,00%
Streptococcus gordonii	0	0,00%	1	2,27%
Granulicatella adiacens	1	5,26%	0	0,00%
Enterococcus faecalis	0	0,00%	3	6,82%
Staphylococcus epidermidis	1	5,26%	5	11,36%
Staphylococcus hominis	0	0,00%	1	2,27%
Staphylococcus pasteuri	0	0,00%	4	9,09%
Staphylococcus aureus	2	10,53%	21	47,73%
Staphylococcus haemolyticus	1	5,26%	0	0,00%
Staphylococcus warneri	2	10,53%	3	6,82%
Bacillus cereus	0	0,00%	1	2,27%

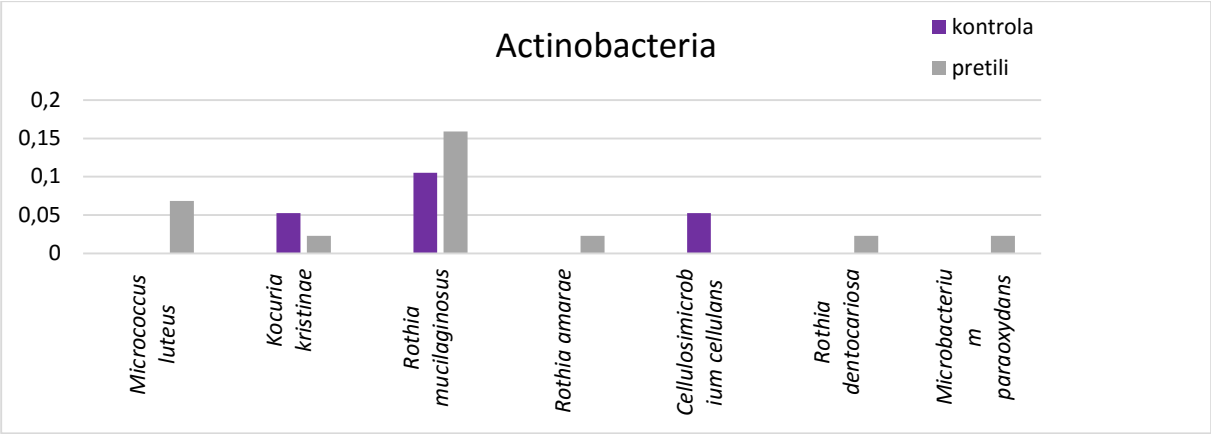
	kontrola	%	pretile	%
Proteobacteria				
Serratia marcescens	1	5,26%	1	2,27%
serratia ureilytica	3	15,79%	0	0,00%
Acinetobacter junii	1	5,26%	0	0,00%
Acinetobacter lwoffii	0	0,00%	2	4,55%
Klebsiella oxytoca	1	5,26%	0	0,00%
Neisseria sp.	4	21,05%	14	31,82%
Escherichia coli	0	0,00%	2	4,55%
Enterobacter cloacae	1	5,26%	0	0,00%
Actinobacteria				
Micrococcus luteus	1	5,26%	3	6,82%
Kocuria kristinae	1	5,26%	1	2,27%
Rothia mucilaginosus	2	10,53%	7	15,91%
Rothia amarae	0	0,00%	1	2,27%
Cellulosimicrobium cellulans	1	5,26%	0	0,00%
Rothia dentocariosa	0	0,00%	1	2,27%
Microbacterium paraoxydan	0	0,00%	1	2,27%
Carstvo: Fungi				
Ascomycota				
Candida albicans	7	36,84%	17	38,64%
Candida glabrata	1	5,26%	2	4,55%
Candida tropicalis	1	5,26%	2	4,55%
Candida dubliniens	1	5,26%	2	4,55%
Candida kefyr	0	0,00%	1	2,27%
Candida krusei	0	0,00%	1	2,27%



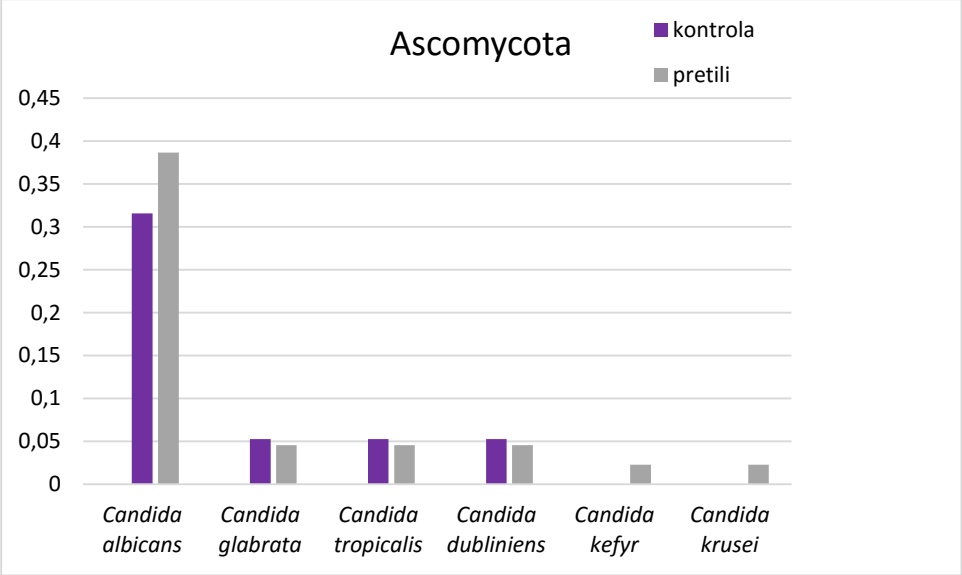
Slika 10. Odnos učestalosti bakterija iz koljena Firmicutes u žena normalnog BMI-a (kontrola) i pretilih



Slika 11. Odnos učestalosti bakterija iz koljena Proteobacteria u žena normalnog BMI-a (kontrola) i pretilih



Slika 12. Odnos učestalosti bakterija iz koljena Actinobacteria u žena normalnog BMI-a (kontrola) i pretilih



Slika 13. Odnos učestalosti kvasaca iz roda *Candida* (koljeno Ascomycota) u žena normalnog BMI-a (kontrola) i pretilih

Statistički se značajno razlikuje učestalost bakterijskih vrsta *Streptococcus oralis, Streptococcus mitis* i *Staphylococcus aureus.*

Bakterija *Streptococcus oralis* učestalija je u žena normalnog BMI-a (p = 0,0439).

Bakterija *Streptococcus mitis* učestalija je u žena normalnog BMI-a (p = 0,0470).

Bakterija *Staphylococcus aureus* učestalija je u pretilih žena (p = 0,0233).

5. RASPRAVA

Ovo istraživanje je pokazalo da su pretile osobe Zagrebačke županije statistički značajno (p = 0,0367) češći nositelji genotipa AA što je i očekivano s obzirom na rezultate već napravljenih istraživanja u svijetu (Frayling i sur. 2007) i na Hvaru (Zhang i sur. 2010).

Nema puno kategorija anketnih pitanja sa statistički značajnim razlikama u navikama žena iz kontrolne skupine i pretilih.

Broj obroka u danu je veći od dva u 90% kontrole i 45,5% pretilih, ali to nije statistički značajno (p = 0,0532). Najveći udio kontrole (60%) kao i najveći udio pretilih (31,8%) ima 3 obroka (p= 0,0537). Nema statistički značajne razlike u broju obroka kontrole i pretilih što je u skladu s očekivanjima i rezultatima Camerona i sur. (2010) da povećan broj obroka ne potiče mršavljenje više nego manji broj obroka, ukoliko se radi o podjednakom broju unesenih kalorija na dan.

Ne doručkuje 15,9% pretilih dok svi u kontrolnoj skupini doručkuju redovito ili neredovito, ali to ipak nije statistički značajno (p = 0,0882) te je u skladu sa studijom znanstvenika Barr i suradnika (2016) da doručkovanje nije dosljedno povezano s BMI-om.

Više ispitanica normalnog BMI-a je svoju svakodnevnu prehranu ocijenila kao uravnoteženu i raznoliku (p=0,0141). Više pretilih je svoju prehranu ocijenilo kao bogatu slatkišima i grickalicama (p =0,0133) i bogatu mesom i mesnim prerađevinama (p =0,006). Ovi svi podaci su statistički značajni i očekivani s obzirom da je pretilost posljedica povećanog unosa kalorija i smanjene potrošnje (O'Rahilly 2009).

Podjednak udio pretilih i kontrole dnevno pojede barem 1 mliječni proizvod. Za očekivati je da pretili ne jedu više mliječnih proizvoda od kontrole te se to poklapa sa zaključkom Rautiainena i sur. (2016) da bi veća konzumacija mliječnih proizvoda mogla biti važna u prevenciji debljanja u srednje starih i starijih žena koje su inicijalno normalne mase.

Nema razlike u navikama dodavanja soli u obrok. Iako istraživanje (Elliot 1991) tvrdi da postoji povezanost dodatka soli i povišenog krvnog tlaka, ova studija ne pokazuje razliku između pretilih koji ne dodaju stol obroku za stolom a imaju povećan krvni tlak i pretilih koji ne dodaju sol obroku za stolom i nemaju povećan krvni tlak (p = 1,0000). Ne postoji ni statistički značajna razlika između pretilih koji imaju povišen krvni tlak i dodaju sol obroku za stolom kad jelo nije dovoljno slano i pretilih koji nemaju povećan krvni tlak i dodaju sol skoro uvijek prije nego probaju (p = 0,3457).

Nema značajne razlike u pušačkim navikama kontrole i pretilih (p = 0,5018). To je u skladu sa zaključkom studije da nema povezanosti pušenja i BMI-a (Zbikowski i sur. 2011).

Nema značajnih razlika (p = 0,1644) u vremenu koje žene iz kontrolne skupine i pretile žene provedu sjedeći manje od 1 sat dnevno, a ni u vremenu koje žene iz kontrolne skupine (40%) i pretile žene (15,9%) provedu sjedeći 3-4 sata dnevno (p = 0,0603). Jedna žena normalnog

BMI-a, ali 27,3% pretilih provede manje od 20 minuta na dan hodajući ili baveći se nekom drugom tjelesnom aktivnošću (p = 0,0885), a za druge kategorije aktivnosti razlika je još i manja. Ovo nije u potpunosti u skladu s očekivanjima jer pretilost posljedica povećanog unosa kalorija i smanjene potrošnje (O'Rahilly 2009) pa je bilo za očekivati da pretili značajno više vremena provedu sjedeći i značajno manje vremena aktivno i još k tome pretila skupina ima veći prosjek godina za 10 godina. Ovakav rezultat može biti posljedica premalog broja ispitanika u studiji te neobjektivnog ispunjavanja ankete.

Ni jedna žena normalnog BMI-a ne spava manje od 6 sati dok 22,7% pretilih ima tu naviku (p = 0,0240). Više žena normalnog BMI-a spava 6 do 7 sati nego pretile (p = 0,0291). Ovakav rezultat je očekivan s obzirom na rezultate Rontoyanni i sur. (2007) da se smanjenjem noćnog sna povećava BMI.

Što se tiče zdravstvenog stanja, u pretilih žena je češći visoki krvni tlak (p = 0,0005). Manje je pretilih osoba koje nemaju bolesti (p = 0,0004). Kada za usporedbu uzmemo od kontrole samo starije žene (41,9 ± 8,52 godina) tada je visoki krvi tlak također statistički značajno učestaliji u pretilih (p = 0,0335), ali broj kontrolnih osoba koje nemaju bolesti nije statistički značajno veći od broja pretilih bez bolesti (p = 0,2552). Ovo je u skladu s očekivanjima jer pretilost povećava rizik od povišenog krvnog tlaka (Huang i sur. 1998). Genotip AA nije povezan (p=1,0000) s povišenim krvnim tlakom što je i pokazala i studija na ljudima s Hvara (Karns i sur. 2011).
Dijabetes ima 17,8 % pretilih, a niti jedna osoba iz kontrolne skupine nema dijabetes te veza pretilosti i dijabetesa u ovom slučaju nije baš statistički značajna (p = 0,0510). Još je manja statistička značajnost (p = 0,3263) kad se za usporedbu od kontrole uzmemo samo starije žene (41,9 ± 8,52 godina). Pošto pretilost povećava rizik od dijabetesa (Sharma 2006), očekivano je da će dijabetes biti statistički značajnije učestaliji u pretilih. Ova studija nije pokazala ni statistički značajnu učestalost dijabetesa u pretilih koji su nosioci genotipa AA za polimorfizam rs9939609 (p = 0,1243) iako alel A povećava rizik od dijabetesa tipa 2 (Binh i sur. 2013). Ovakav rezultat vjerojatno je posljedica malog broja ispitanica.
Iz ovakvih rezultata ankete može se zaključiti i statistički je značajno da se pretili hrane manje zdravo, češće imaju povišen krvni tlak te spavaju manje od osoba normalnog BMI-a.

Razlika u sastavu mikroorganizma usne šupljine osoba normalnog BMI-a i pretilih je još uvijek nepoznanica. Istraživanje koje su proveli Goodson i suradnici (2009) otkrilo je kvantitativnu razliku u 7 vrsta bakterija i to metodom neovisnom o uzgoju bakterija u kulturi. Za razliku od tog istraživanje, ovo istraživanje ima nekoliko ograničenja zbog kojih nije moguće dobiti rezultate kakve su oni dobili. Ovo istraživanje je samo kvalitativno i moguće je identificirati samo bakterije koje su uzgojive na podlogama LB i MRS, na 37 °C u aerobnim uvjetima. Nadalje, neke izrasle kolonije bile su presitne te ih nije bilo moguće identificirati. Ovakvim načinom identificirano je 45 vrsta mikroorganizama, a za tri je utvrđena statistički značajna razlika u učestalosti između žena normalnog BMI-a i pretilih. Bakterije *Streptococcus oralis* (p = 0,0439) i *Streptococcus mitis* (p = 0,0470) su učestalije u osoba normalnog BMI-a. U Goodsonovom istraživanju medijan udjela broja bakterija *Streptococcus*

mitis i *Streptococcus oralis* u ukupnom broju bakterija u slini je veći u osoba veće tjelesne mase pa je za očekivati da će biti učestalije u pretilih, ali rezultati su pokazali suprotno, ako se uopće mogu izvoditi zaključci o očekivanim kvalitativnim rezultatima na temelju kvalitativnih podataka.

Bakterija *Staphylococcus aureus* učestalija je u pretilih (p = 0,0233) što je bilo i za očekivati s obzirom da postoji pozitivna korelacija BMI-a i kolonizacije nosa bakterijom *S. aureus* među mlađim i premenopauznim ženama (Olsen i sur. 2013).

Potrebna su dodatna istraživanja o povezanosti pretilosti, polimorfizma rs9939609 i sastava mikroorganizama usne šupljine, ali na većem broju ispitanika, detaljnijom anketom te kvalitativnom i kvantitativnom metodom analize mikroorganizama usne šupljine neovisnom o uzgoju u kulturi.

6. ZAKLJUČCI

1. Žene Zagrebačke županije normalnog BMI-a i pretile žene Zagrebačke županije statistički se značajno razlikuju u učestalosti genotipa AA polimorfizma rs9939609 gena *FTO.* Pretile žene Zagrebačke županije statistički su značajno učestaliji nositelji genotipa AA polimorfizma rs9939609 gena *FTO.*

2. Žene Zagrebačke županije normalnog BMI-a i pretile žene Zagrebačke županije statistički se značajno razlikuju u učestalosti bakterija *Streptococcus mitis, Streptococcus oralis* i *Staphylococcus aureus.* Bakterije *Streptococcus oralis* i *Streptococcus mitis* su učestalije u žena normalnog BMI-a, a *Staphylococcus aureus* je učestaliji u pretilih žena.

3. Žene Zagrebačke županije normalnog BMI-a i pretile žene Zagrebačke županije statistički se značajno razlikuju u nekim bolestima te nekim životnim navikama. Pretile žene češće imaju povišeni krvni tlak. Prehrana pretilih žena je bogatija mesom i mesnim prerađevinama te slatkišima i grickalicama. Žene normalnog BMI-a hrane se više uravnoteženo i raznovrsno. Više pretilih žena spava manje od 6 sati, a više žena normalnog BMI-a spava 6-7 sati.

4. Ova studija nije pokazala statistički značajnu veću učestalost ni bolesti ni loših životnih navika (prehrana, pušenje, tjelesna aktivnost, san) u pretilih koji su nosioci genotipa AA za polimorfizam rs9939609 gena FTO.

7. LITERATURA

Albuquerque D, Stice E, Rodriguez-Lopez R, Manco L, Nobrega C. Current review of genetics of human obesity: from molecular mechanisms to an evolutionary perspective. *Mol Genet Genomics* 290: 1191–1221, 2015.

Allison DB, Heshka S, Neale MC, Heymsfield SB. Race effects in the genetics of adolescents' body mass index. *Int J Obes Relat Metab Disord* 18: 363–368, 1994.

Anderson SE, Cohen P, Naumova EN, Jacques PF, Must A. Adolescent obesity and risk for subsequent major depressive disorder and anxiety disorder: prospective evidence. *Psychosom Med* 69: 740–747, 2007.

Avenell A, Broom J, Brown TJ, Poobalan A, Aucott L, Stearns SC, Smith WCS, Jung RT, Campbell MK, Grant AM. Systematic review of the long-term effects and economic consequences of treatments for obesity and implications for health improvement. *Health Technol Assess* 8: iii–iv, 1–182, 2004.

Barr SI, DiFrancesco L, Fulgoni VL 3rd. Association of breakfast consumption with body mass index and prevalence of overweight/obesity in a nationally-representative survey of Canadian adults. *Nutr J* 15: 33, 2016.

Bell CG, Walley AJ, Froguel P. The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet* 6: 221–234, 2005.

Binh TQ, Phuong PT, Nhung BT, Thoang DD, Lien HT, Thanh D Van. Association of the common FTO-rs9939609 polymorphism with type 2 diabetes, independent of obesity-related traits in a Vietnamese population. *Gene* 513: 31–35, 2013.

Brennan P, McKay J, Moore L, Zaridze D, Mukeria A, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Bencko V, Foretova L, Janout V, Chow W-H, Rothman N, Chabrier A, Gaborieau V, Timpson N, Hung RJ, Smith GD. Obesity and cancer: Mendelian randomization approach utilizing the FTO genotype. *Int J Epidemiol* 38: 971–975, 2009.

Cameron JD, Cyr M-J, Doucet E. Increased meal frequency does not promote greater weight loss in subjects who were prescribed an 8-week equi-energetic energy-restricted diet. *Br J Nutr* 103: 1098–1101, 2010.

Cauchi S, Stutzmann F, Cavalcanti-Proenca C, Durand E, Pouta A, Hartikainen A-L, Marre M, Vol S, Tammelin T, Laitinen J, Gonzalez-Izquierdo A, Blakemore AIF, Elliott P, Meyre D, Balkau B, Jarvelin M-R, Froguel P. Combined effects of MC4R and FTO common genetic variants on obesity in European general populations. *J Mol Med (Berl)* 87: 537–546, 2009.

Chagnon YC, Perusse L, Bouchard C. Familial aggregation of obesity, candidate genes and quantitative trait loci. *Curr Opin Lipidol* 8: 205–211, 1997.

Chung WK. An overview of mongenic and syndromic obesities in humans. *Pediatr Blood Cancer* 58: 122–128, 2012.

Cserjesi R, Molnar D, Luminet O, Lenard L. Is there any relationship between obesity and mental flexibility in children? *Appetite* 49: 675–678, 2007.

Dattilo AM, Kris-Etherton PM. Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 56: 320–328, 1992.

Delahanty RJ, Beeghly-Fadiel A, Xiang Y-B, Long J, Cai Q, Wen W, Xu W-H, Cai H, He J, Gao Y-T, Zheng W, Shu XO. Association of obesity-related genetic variants with endometrial cancer risk: a report from the Shanghai Endometrial Cancer Genetics Study. *Am J*

Epidemiol 174: 1115–1126, 2011.

Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Korner A, Jacobson P, Carlsson LMS, Kiess W, Vatin V, Lecoeur C, Delplanque J, Vaillant E, Pattou F, Ruiz J, Weill J, Levy-Marchal C, Horber F, Potoczna N, Hercberg S, Le Stunff C, Bougneres P, Kovacs P, Marre M, Balkau B, Cauchi S, Chevre J-C, Froguel P. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 39: 724–726, 2007.

Dlouha D, Pitha J, Lanska V, Hubacek JA. Association between FTO 1st intron tagging variant and telomere length in middle aged females. 3PMFs study. *Clin Chim Acta* 413: 1222–1225, 2012.

Elliott P. Observational studies of salt and blood pressure. *Hypertension* 17: I3–8, 1991.

Emambokus N, Wang C. Brown Adipocyte Focus. *Cell Metab* 11: 241, 2010.

Fall T, Hagg S, Magi R, Ploner A, Fischer K, Horikoshi M, Sarin A-P, Thorleifsson G, Ladenvall C, Kals M, Kuningas M, Draisma HHM, Ried JS, van Zuydam NR, Huikari V, Mangino M, Sonestedt E, Benyamin B, Nelson CP, Rivera N V, Kristiansson K, Shen H-Y, Havulinna AS, Dehghan A, Donnelly LA, Kaakinen M, Nuotio M-L, Robertson N, de Bruijn RFAG, Ikram MA, Amin N, Balmforth AJ, Braund PS, Doney ASF, Doring A, Elliott P, Esko T, Franco OH, Gretarsdottir S, Hartikainen A-L, Heikkila K, Herzig K-H, Holm H, Hottenga JJ, Hypponen E, Illig T, Isaacs A, Isomaa B, Karssen LC, Kettunen J, Koenig W, Kuulasmaa K, Laatikainen T, Laitinen J, Lindgren C, Lyssenko V, Laara E, Rayner NW, Mannisto S, Pouta A, Rathmann W, Rivadeneira F, Ruokonen A, Savolainen MJ, Sijbrands EJG, Small KS, Smit JH, Steinthorsdottir V, Syvanen A-C, Taanila A, Tobin MD, Uitterlinden AG, Willems SM, Willemsen G, Witteman J, Perola M, Evans A, Ferrieres J, Virtamo J, Kee F, Tregouet D-A, Arveiler D, Amouyel P, Ferrario MM, Brambilla P, Hall AS, Heath AC, Madden PAF, Martin NG, Montgomery GW, Whitfield JB, Jula A, Knekt P, Oostra B, van Duijn CM, Penninx BWJH, Smith GD, Kaprio J, Samani NJ, Gieger C, Peters A, Wichmann HE, Boomsma DI, de Geus EJC, Tuomi T, Power C, Hammond CJ, Spector TD, Lind L, Orho-Melander M, Palmer CNA, Morris AD, Groop L, Jarvelin M-R, Salomaa V, Vartiainen E, Hofman A, Ripatti S, Metspalu A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K, Pedersen NL, McCarthy MI, Ingelsson E, Prokopenko I. The role of adiposity in cardiometabolic traits: a Mendelian randomization analysis. *PLoS Med* 10: e1001474, 2013.

Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 341: 879–884, 1999.

Farooqi IS, O'Rahilly S. Monogenic obesity in humans. *Annu Rev Med* 56: 443–458, 2005.

Farooqi IS. Genetic and hereditary aspects of childhood obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19: 359–374, 2005.

Farooqi IS. Monogenic human obesity syndromes. *Prog Brain Res* 153: 119–125, 2006.

Fawcett KA, Barroso I. The genetics of obesity: FTO leads the way. *Trends Genet* 26: 266–274, 2010.

Finucane MM, Stevens GA, Cowan M, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, Singh GM, Gutierrez HR, Lu Y, Bahalim AN, Farzadfar F, Riley LM, Ezzati M. National, regional, and global trends in body mass index since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet (London, England)* 377: 557–567, 2011.

Fischer J, Koch L, Emmerling C, Vierkotten J, Peters T, Bruning JC, Ruther U. Inactivation of

the Fto gene protects from obesity. *Nature* 458: 894–898, 2009.

Fisher E, Schulze MB, Stefan N, Haring H-U, Doring F, Joost H-G, Al-Hasani H, Boeing H, Pischon T. Association of the FTO rs9939609 single nucleotide polymorphism with C-reactive protein levels. *Obesity (Silver Spring)* 17: 330–334, 2009.

Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *JAMA* 307: 491–497, 2012.

Frayling TM, Ong K. Piecing together the FTO jigsaw. *Genome Biol* 12: 104, 2011.

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JRB, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch A-M, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin M-R, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJF, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CNA, Doney ASF, Morris AD, Smith GD, Hattersley AT, McCarthy MI. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316: 889–894, 2007.

Fredriksson R, Hagglund M, Olszewski PK, Stephansson O, Jacobsson JA, Olszewska AM, Levine AS, Lindblom J, Schioth HB. The obesity gene, FTO, is of ancient origin, up-regulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology* 149: 2062–2071, 2008.

Garcia-Closas M, Couch FJ, Lindstrom S, Michailidou K, Schmidt MK, Brook MN, Orr N, Rhie SK, Riboli E, Feigelson HS, Le Marchand L, Buring JE, Eccles D, Miron P, Fasching PA, Brauch H, Chang-Claude J, Carpenter J, Godwin AK, Nevanlinna H, Giles GG, Cox A, Hopper JL, Bolla MK, Wang Q, Dennis J, Dicks E, Howat WJ, Schoof N, Bojesen SE, Lambrechts D, Broeks A, Andrulis IL, Guenel P, Burwinkel B, Sawyer EJ, Hollestelle A, Fletcher O, Winqvist R, Brenner H, Mannermaa A, Hamann U, Meindl A, Lindblom A, Zheng W, Devillee P, Goldberg MS, Lubinski J, Kristensen V, Swerdlow A, Anton-Culver H, Dork T, Muir K, Matsuo K, Wu AH, Radice P, Teo SH, Shu X-O, Blot W, Kang D, Hartman M, Sangrajrang S, Shen C-Y, Southey MC, Park DJ, Hammet F, Stone J, Veer LJV, Rutgers EJ, Lophatananon A, Stewart-Brown S, Siriwanarangsan P, Peto J, Schrauder MG, Ekici AB, Beckmann MW, Dos Santos Silva I, Johnson N, Warren H, Tomlinson I, Kerin MJ, Miller N, Marme F, Schneeweiss A, Sohn C, Truong T, Laurent-Puig P, Kerbrat P, Nordestgaard BG, Nielsen SF, Flyger H, Milne RL, Perez JIA, Menendez P, Muller H, Arndt V, Stegmaier C, Lichtner P, Lochmann M, Justenhoven C, Ko Y-D, Muranen TA, Aittomaki K, Blomqvist C, Greco D, Heikkinen T, Ito H, Iwata H, Yatabe Y, Antonenkova NN, Margolin S, Kataja V, Kosma V-M, Hartikainen JM, Balleine R, Tseng C-C, Berg D Van Den, Stram DO, Neven P, Dieudonne A-S, Leunen K, Rudolph A, Nickels S, Flesch-Janys D, Peterlongo P, Peissel B, Bernard L, Olson JE, Wang X, Stevens K, Severi G, Baglietto L, McLean C, Coetzee GA, Feng Y, Henderson BE, Schumacher F, Bogdanova N V, Labreche F, Dumont M, Yip CH, Taib NAM, Cheng C-Y, Shrubsole M, Long J, Pylkas K, Jukkola-Vuorinen A, Kauppila S, Knight JA, Glendon G, Mulligan AM, Tollenaar RAEM, Seynaeve CM, Kriege M, Hooning MJ, van den Ouweland AMW, van Deurzen CHM, Lu W, Gao Y-T, Cai H, Balasubramanian SP, Cross SS, Reed MWR, Signorello L, Cai Q, Shah M, Miao H, Chan CW, Chia KS, Jakubowska A, Jaworska K, Durda K, Hsiung C-N, Wu P-E, Yu J-C, Ashworth A, Jones M, Tessier DC, Gonzalez-Neira A, Pita G, Alonso MR, Vincent D, Bacot F, Ambrosone CB, Bandera E V, John EM, Chen GK, Hu JJ, Rodriguez-Gil JL, Bernstein L, Press MF, Ziegler RG, Millikan RM, Deming-Halverson SL, Nyante S, Ingles SA, Waisfisz Q, Tsimiklis H, Makalic E,

Schmidt D, Bui M, Gibson L, Muller-Myhsok B, Schmutzler RK, Hein R, Dahmen N, Beckmann L, Aaltonen K, Czene K, Irwanto A, Liu J, Turnbull C, Rahman N, Meijers-Heijboer H, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, Olswold C, Slager S, Pilarski R, Ademuyiwa F, Konstantopoulou I, Martin NG, Montgomery GW, Slamon DJ, Rauh C, Lux MP, Jud SM, Bruning T, Weaver J, Sharma P, Pathak H, Tapper W, Gerty S, Durcan L, Trichopoulos D, Tumino R, Peeters PH, Kaaks R, Campa D, Canzian F, Weiderpass E, Johansson M, Khaw K-T, Travis R, Clavel-Chapelon F, Kolonel LN, Chen C, Beck A, Hankinson SE, Berg CD, Hoover RN, Lissowska J, Figueroa JD, Chasman DI, Gaudet MM, Diver WR, Willett WC, Hunter DJ, Simard J, Benitez J, Dunning AM, Sherman ME, Chenevix-Trench G, Chanock SJ, Hall P, Pharoah PDP, Vachon C, Easton DF, Haiman CA, Kraft P. Genome-wide association studies identify four ER negative-specific breast cancer risk loci. *Nat Genet* 45: 392–8, 398e1–2, 2013.

Gaudet MM, Yang HP, Bosquet JG, Healey CS, Ahmed S, Dunning AM, Easton DF, Spurdle AB, Ferguson K, O'Mara T, Lambrechts D, Despierre E, Vergote I, Amant F, Lacey JVJ, Lissowska J, Peplonska B, Brinton LA, Chanock S, Garcia-Closas M. No association between FTO or HHEX and endometrial cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19: 2106–2109, 2010.

Gerken T, Girard CA, Tung Y-CL, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS, Yeo GSH, McDonough MA, Cunliffe S, McNeill LA, Galvanovskis J, Rorsman P, Robins P, Prieur X, Coll AP, Ma M, Jovanovic Z, Farooqi IS, Sedgwick B, Barroso I, Lindahl T, Ponting CP, Ashcroft FM, O'Rahilly S, Schofield CJ. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 318: 1469–1472, 2007.

Gonzalez-Jimenez E, Aguilar Cordero MJ, Padilla Lopez CA, Garcia Garcia I. [Monogenic human obesity: role of the leptin-melanocortin system in the regulation of food intake and body weight in humans]. *An Sist Sanit Navar* 35: 285–293, 2012.

Gonzalez-Sanchez JL, Zabena C, Martinez-Larrad MT, Martinez-Calatrava MJ, Perez-Barba M, Serrano-Rios M. Variant rs9939609 in the FTO gene is associated with obesity in an adult population from Spain. *Clin Endocrinol (Oxf)* 70: 390–393, 2009.

Goodson JM, Groppo D, Halem S, Carpino E. Is obesity an oral bacterial disease? *J Dent Res* 88: 519–523, 2009.

Goran MI. Genetic influences on human energy expenditure and substrate utilization. *Behav Genet* 27: 389–399, 1997.

Graff M, Ngwa JS, Workalemahu T, Homuth G, Schipf S, Teumer A, Volzke H, Wallaschofski H, Abecasis GR, Edward L, Francesco C, Sanna S, Scheet P, Schlessinger D, Sidore C, Xiao X, Wang Z, Chanock SJ, Jacobs KB, Hayes RB, Hu F, Van Dam RM, Crout RJ, Marazita ML, Shaffer JR, Atwood LD, Fox CS, Heard-Costa NL, White C, Choh AC, Czerwinski SA, Demerath EW, Dyer TD, Towne B, Amin N, Oostra BA, Van Duijn CM, Zillikens MC, Esko T, Nelis M, Nikopensius T, Metspalu A, Strachan DP, Monda K, Qi L, North KE, Cupples LA, Gordon-Larsen P, Berndt SI. Genome-wide analysis of BMI in adolescents and young adults reveals additional insight into the effects of genetic loci over the life course. *Hum Mol Genet* 22: 3597–3607, 2013.

Hallman DM, Friedel VC, Eissa MAH, Boerwinkle E, Huber JCJ, Harrist RB, Srinivasan SR, Chen W, Dai S, Labarthe DR, Berenson GS. The association of variants in the FTO gene with longitudinal body mass index profiles in non-Hispanic white children and adolescents. *Int J Obes (Lond)* 36: 61–68, 2012.

Han Z, Niu T, Chang J, Lei X, Zhao M, Wang Q, Cheng W, Wang J, Feng Y, Chai J. Crystal structure of the FTO protein reveals basis for its substrate specificity. *Nature* 464:

1205–1209, 2010.

Hardy R, Wills AK, Wong A, Elks CE, Wareham NJ, Loos RJF, Kuh D, Ong KK. Life course variations in the associations between FTO and MC4R gene variants and body size. *Hum Mol Genet* 19: 545–552, 2010.

Hart DJ, Spector TD. The relationship of obesity, fat distribution and osteoarthritis in women in the general population: the Chingford Study. *J Rheumatol* 20: 331–335, 1993.

Hinney A, Hebebrand J. Polygenic obesity in humans. *Obes Facts* 1: 35–42, 2008.

Hinney A, Nguyen TT, Scherag A, Friedel S, Bronner G, Muller TD, Grallert H, Illig T, Wichmann H-E, Rief W, Schafer H, Hebebrand J. Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. *PLoS One* 2: e1361, 2007.

Horikoshi M, Yaghootkar H, Mook-Kanamori DO, Sovio U, Taal HR, Hennig BJ, Bradfield JP, St Pourcain B, Evans DM, Charoen P, Kaakinen M, Cousminer DL, Lehtimaki T, Kreiner-Moller E, Warrington NM, Bustamante M, Feenstra B, Berry DJ, Thiering E, Pfab T, Barton SJ, Shields BM, Kerkhof M, van Leeuwen EM, Fulford AJ, Kutalik Z, Zhao JH, den Hoed M, Mahajan A, Lindi V, Goh L-K, Hottenga J-J, Wu Y, Raitakari OT, Harder MN, Meirhaeghe A, Ntalla I, Salem RM, Jameson KA, Zhou K, Monies DM, Lagou V, Kirin M, Heikkinen J, Adair LS, Alkuraya FS, Al-Odaib A, Amouyel P, Andersson EA, Bennett AJ, Blakemore AIF, Buxton JL, Dallongeville J, Das S, de Geus EJC, Estivill X, Flexeder C, Froguel P, Geller F, Godfrey KM, Gottrand F, Groves CJ, Hansen T, Hirschhorn JN, Hofman A, Hollegaard M V, Hougaard DM, Hypponen E, Inskip HM, Isaacs A, Jorgensen T, Kanaka-Gantenbein C, Kemp JP, Kiess W, Kilpelainen TO, Klopp N, Knight BA, Kuzawa CW, McMahon G, Newnham JP, Niinikoski H, Oostra BA, Pedersen L, Postma DS, Ring SM, Rivadeneira F, Robertson NR, Sebert S, Simell O, Slowinski T, Tiesler CMT, Tonjes A, Vaag A, Viikari JS, Vink JM, Vissing NH, Wareham NJ, Willemsen G, Witte DR, Zhang H, Zhao J, Wilson JF, Stumvoll M, Prentice AM, Meyer BF, Pearson ER, Boreham CAG, Cooper C, Gillman MW, Dedoussis G V, Moreno LA, Pedersen O, Saarinen M, Mohlke KL, Boomsma DI, Saw S-M, Lakka TA, Korner A, Loos RJF, Ong KK, Vollenweider P, van Duijn CM, Koppelman GH, Hattersley AT, Holloway JW, Hocher B, Heinrich J, Power C, Melbye M, Guxens M, Pennell CE, Bonnelykke K, Bisgaard H, Eriksson JG, Widen E, Hakonarson H, Uitterlinden AG, Pouta A, Lawlor DA, Smith GD, Frayling TM, McCarthy MI, Grant SFA, Jaddoe VW V, Jarvelin M-R, Timpson NJ, Prokopenko I, Freathy RM. New loci associated with birth weight identify genetic links between intrauterine growth and adult height and metabolism. *Nat Genet* 45: 76–82, 2013.

Huang Z, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Stampfer MJ, Speizer FE, Colditz GA. Body weight, weight change, and risk for hypertension in women. *Ann Intern Med* 128: 81–88, 1998.

Iles MM, Law MH, Stacey SN, Han J, Fang S, Pfeiffer R, Harland M, Macgregor S, Taylor JC, Aben KK, Akslen LA, Avril M-F, Azizi E, Bakker B, Benediktsdottir KR, Bergman W, Scarra GB, Brown KM, Calista D, Chaudru V, Fargnoli MC, Cust AE, Demenais F, de Waal AC, Debniak T, Elder DE, Friedman E, Galan P, Ghiorzo P, Gillanders EM, Goldstein AM, Gruis NA, Hansson J, Helsing P, Hocevar M, Hoiom V, Hopper JL, Ingvar C, Janssen M, Jenkins MA, Kanetsky PA, Kiemeney LA, Lang J, Lathrop GM, Leachman S, Lee JE, Lubinski J, Mackie RM, Mann GJ, Martin NG, Mayordomo JI, Molven A, Mulder S, Nagore E, Novakovic S, Okamoto I, Olafsson JH, Olsson H, Pehamberger H, Peris K, Grasa MP, Planelles D, Puig S, Puig-Butille JA, Randerson-Moor J, Requena C,

Rivoltini L, Rodolfo M, Santinami M, Sigurgeirsson B, Snowden H, Song F, Sulem P, Thorisdottir K, Tuominen R, Van Belle P, van der Stoep N, van Rossum MM, Wei Q, Wendt J, Zelenika D, Zhang M, Landi MT, Thorleifsson G, Bishop DT, Amos CI, Hayward NK, Stefansson K, Bishop JAN, Barrett JH. A variant in FTO shows association with melanoma risk not due to BMI. *Nat Genet* 45: 428–32, 432e1, 2013.

Jacobsson JA, Schioth HB, Fredriksson R. The impact of intronic single nucleotide polymorphisms and ethnic diversity for studies on the obesity gene FTO. *Obes Rev* 13: 1096–1109, 2012.

Jess T, Zimmermann E, Kring SII, Berentzen T, Holst C, Toubro S, Astrup A, Hansen T, Pedersen O, Sorensen TIA. Impact on weight dynamics and general growth of the common FTO rs9939609: a longitudinal Danish cohort study. *Int J Obes (Lond)* 32: 1388–1394, 2008.

Jia G, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng G, Yang Y, Yi C, Lindahl T, Pan T, Yang Y-G, He C. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol* 7: 885–887, 2011.

Jia G, Yang C-G, Yang S, Jian X, Yi C, Zhou Z, He C. Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS Lett* 582: 3313–3319, 2008.

Jonsson A, Renstrom F, Lyssenko V, Brito EC, Isomaa B, Berglund G, Nilsson PM, Groop L, Franks PW. Assessing the effect of interaction between an FTO variant (rs9939609) and physical activity on obesity in 15,925 Swedish and 2,511 Finnish adults. *Diabetologia* 52: 1334–1338, 2009.

Kales A, Cadieux RJ, Bixler EO, Soldatos CR, Vela-Bueno A, Misoul CA, Locke TW. Severe obstructive sleep apnea--I: Onset, clinical course, and characteristics. *J Chronic Dis* 38: 419–425, 1985.

Karns R, Zhang G, Jeran N, Havas-Augustin D, Missoni S, Niu W, Indugula SR, Sun G, Durakovic Z, Narancic NS, Rudan P, Chakraborty R, Deka R. Replication of genetic variants from genome-wide association studies with metabolic traits in an island population of the Adriatic coast of Croatia. *Eur J Hum Genet* 19: 341–346, 2011.

Kilpelainen TO, den Hoed M, Ong KK, Grontved A, Brage S, Jameson K, Cooper C, Khaw K-T, Ekelund U, Wareham NJ, Loos RJF. Obesity-susceptibility loci have a limited influence on birth weight: a meta-analysis of up to 28,219 individuals. *Am J Clin Nutr* 93: 851–860, 2011.

Klesges RC, Meyers AW, Klesges LM, La Vasque ME. Smoking, body weight, and their effects on smoking behavior: a comprehensive review of the literature. *Psychol Bull* 106: 204–230, 1989.

Kurth T, Gaziano JM, Rexrode KM, Kase CS, Cook NR, Manson JE, Buring JE. Prospective study of body mass index and risk of stroke in apparently healthy women. *Circulation* 111: 1992–1998, 2005.

Larder R, Cheung MKM, Tung YCL, Yeo GSH, Coll AP. Where to go with FTO? *Trends Endocrinol Metab* 22: 53–59, 2011.

Lavie CJ, Milani R V. Effects of cardiac rehabilitation, exercise training, and weight reduction on exercise capacity, coronary risk factors, behavioral characteristics, and quality of life in obese coronary patients. *Am J Cardiol* 79: 397–401, 1997.

Lewis SJ, Murad A, Chen L, Davey Smith G, Donovan J, Palmer T, Hamdy F, Neal D, Lane JA, Davis M, Cox A, Martin RM. Associations between an obesity related genetic variant

(FTO rs9939609) and prostate cancer risk. *PLoS One* 5: e13485, 2010.

Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022–1023, 2006.

Li G, Chen Q, Wang L, Ke D, Yuan Z. Association between FTO gene polymorphism and cancer risk: evidence from 16,277 cases and 31,153 controls. *Tumour Biol* 33: 1237–1243, 2012.

Lim U, Wilkens LR, Monroe KR, Caberto C, Tiirikainen M, Cheng I, Park SL, Stram DO, Henderson BE, Kolonel LN, Haiman CA, Le Marchand L. Susceptibility variants for obesity and colorectal cancer risk: the multiethnic cohort and PAGE studies. *Int J cancer* 131: E1038–43, 2012.

Llewellyn CH, Trzaskowski M, Plomin R, Wardle J. Finding the missing heritability in pediatric obesity: the contribution of genome-wide complex trait analysis. *Int J Obes (Lond)* 37: 1506–1509, 2013.

Long J, Zhang B, Signorello LB, Cai Q, Deming-Halverson S, Shrubsole MJ, Sanderson M, Dennis J, Michailidou K, Easton DF, Shu X-O, Blot WJ, Zheng W. Evaluating genome-wide association study-identified breast cancer risk variants in African-American women. *PLoS One* 8: e58350, 2013.

Loos RJF, Yeo GSH. The bigger picture of FTO: the first GWAS-identified obesity gene. *Nat Rev Endocrinol* 10: 51–61, 2014.

Lurie G, Gaudet MM, Spurdle AB, Carney ME, Wilkens LR, Yang HP, Weiss NS, Webb PM, Thompson PJ, Terada K, Setiawan VW, Rebbeck TR, Prescott J, Orlow I, O'Mara T, Olson SH, Narod SA, Matsuno RK, Lissowska J, Liang X, Levine DA, Le Marchand L, Kolonel LN, Henderson BE, Garcia-Closas M, Doherty JA, De Vivo I, Chen C, Brinton LA, Akbari MR, Goodman MT. The obesity-associated polymorphisms FTO rs9939609 and MC4R rs17782313 and endometrial cancer risk in non-Hispanic white women. *PLoS One* 6: e16756, 2011.

Machiela MJ, Lindstrom S, Allen NE, Haiman CA, Albanes D, Barricarte A, Berndt SI, Bueno-de-Mesquita HB, Chanock S, Gaziano JM, Gapstur SM, Giovannucci E, Henderson BE, Jacobs EJ, Kolonel LN, Krogh V, Ma J, Stampfer MJ, Stevens VL, Stram DO, Tjonneland A, Travis R, Willett WC, Hunter DJ, Le Marchand L, Kraft P. Association of type 2 diabetes susceptibility variants with advanced prostate cancer risk in the Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. *Am J Epidemiol* 176: 1121–1129, 2012.

Munafo MR, Tilling K, Ben-Shlomo Y. Smoking status and body mass index: a longitudinal study. *Nicotine Tob Res* 11: 765–771, 2009.

Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, Mullany EC, Biryukov S, Abbafati C, Abera SF, Abraham JP, Abu-Rmeileh NME, Achoki T, AlBuhairan FS, Alemu ZA, Alfonso R, Ali MK, Ali R, Guzman NA, Ammar W, Anwari P, Banerjee A, Barquera S, Basu S, Bennett DA, Bhutta Z, Blore J, Cabral N, Nonato IC, Chang J-C, Chowdhury R, Courville KJ, Criqui MH, Cundiff DK, Dabhadkar KC, Dandona L, Davis A, Dayama A, Dharmaratne SD, Ding EL, Durrani AM, Esteghamati A, Farzadfar F, Fay DFJ, Feigin VL, Flaxman A, Forouzanfar MH, Goto A, Green MA, Gupta R, Hafezi-Nejad N, Hankey GJ, Harewood HC, Havmoeller R, Hay S, Hernandez L, Husseini A, Idrisov BT, Ikeda N, Islami F, Jahangir E, Jassal SK, Jee SH, Jeffreys M, Jonas JB, Kabagambe EK, Khalifa SEAH, Kengne AP, Khader YS, Khang Y-H, Kim D, Kimokoti RW, Kinge JM, Kokubo Y, Kosen S, Kwan G, Lai T, Leinsalu M, Li Y, Liang X, Liu S, Logroscino G, Lotufo PA, Lu Y, Ma J, Mainoo NK, Mensah GA, Merriman TR, Mokdad AH, Moschandreas J, Naghavi M, Naheed A, Nand D, Narayan KMV, Nelson EL, Neuhouser ML, Nisar MI, Ohkubo T,

Oti SO, Pedroza A, Prabhakaran D, Roy N, Sampson U, Seo H, Sepanlou SG, Shibuya K, Shiri R, Shiue I, Singh GM, Singh JA, Skirbekk V, Stapelberg NJC, Sturua L, Sykes BL, Tobias M, Tran BX, Trasande L, Toyoshima H, van de Vijver S, Vasankari TJ, Veerman JL, Velasquez-Melendez G, Vlassov VV, Vollset SE, Vos T, Wang C, Wang X, Weiderpass E, Werdecker A, Wright JL, Yang YC, Yatsuya H, Yoon J, Yoon S-J, Zhao Y, Zhou M, Zhu S, Lopez AD, Murray CJL, Gakidou E. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet (London, England)* 384: 766–781, 2014.

Nguyen DM, El-Serag HB. The epidemiology of obesity. *Gastroenterol Clin North Am* 39: 1–7, 2010.

O'Rahilly S. Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. *Nature* 462: 307–314, 2009.

Olsen K, Danielsen K, Wilsgaard T, Sangvik M, Sollid JUE, Thune I, Eggen AE, Simonsen GS, Furberg A-S. Obesity and Staphylococcus aureus nasal colonization among women and men in a general population. *PLoS One* 8: e63716, 2013.

Pierce BL, Austin MA, Ahsan H. Association study of type 2 diabetes genetic susceptibility variants and risk of pancreatic cancer: an analysis of PanScan-I data. *Cancer Causes Control* 22: 877–883, 2011.

Pitman RT, Fong JT, Billman P, Puri N. Knockdown of the fat mass and obesity gene disrupts cellular energy balance in a cell-type specific manner. *PLoS One* 7: e38444, 2012.

Poritsanos NJ, Lew PS, Fischer J, Mobbs C V, Nagy JI, Wong D, Ruther U, Mizuno TM. Impaired hypothalamic Fto expression in response to fasting and glucose in obese mice. *Nutr Diabetes* 1: e19, 2011.

Qi L, Kang K, Zhang C, van Dam RM, Kraft P, Hunter D, Lee C-H, Hu FB. Fat mass-and obesity-associated (FTO) gene variant is associated with obesity: longitudinal analyses in two cohort studies and functional test. *Diabetes* 57: 3145–3151, 2008.

Ramachandran A, Chamukuttan S, Shetty SA, Arun N, Susairaj P. Obesity in Asia--is it different from rest of the world. *Diabetes Metab Res Rev* 28 Suppl 2: 47–51, 2012.

Ranadive SA, Vaisse C. Lessons from extreme human obesity: monogenic disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37: 733–51, x, 2008.

Rautiainen S, Wang L, Lee I-M, Manson JE, Buring JE, Sesso HD. Dairy consumption in association with weight change and risk of becoming overweight or obese in middle-aged and older women: a prospective cohort study. *Am J Clin Nutr* 103: 979–988, 2016.

Rontoyanni VG, Baic S, Cooper AR. Association between nocturnal sleep duration, body fatness, and dietary intake in Greek women. *Nutrition* 23: 773–777, 2007.

Berg A, Berdel D, Borte M, Herbarth O, Kramer U, Illig T, Wichmann H-E, Hebebrand J, Heinrich J. Associations between BMI and the FTO gene are age dependent: results from the GINI and LISA birth cohort studies up to age 6 years. *Obes Facts* 3: 173–180, 2010.

Sanchez-Pulido L, Andrade-Navarro MA. The FTO (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. *BMC Biochem* 8: 23, 2007.

Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU, Prokunina-Olsson L, Ding C-J, Swift AJ, Narisu N, Hu T, Pruim R,

Xiao R, Li X-Y, Conneely KN, Riebow NL, Sprau AG, Tong M, White PP, Hetrick KN, Barnhart MW, Bark CW, Goldstein JL, Watkins L, Xiang F, Saramies J, Buchanan TA, Watanabe RM, Valle TT, Kinnunen L, Abecasis GR, Pugh EW, Doheny KF, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke M. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316: 1341–1345, 2007.

Scuteri A, Sanna S, Chen W-M, Uda M, Albai G, Strait J, Najjar S, Nagaraja R, Orru M, Usala G, Dei M, Lai S, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Ehret GB, Fink AA, Weder AB, Cooper RS, Galan P, Chakravarti A, Schlessinger D, Cao A, Lakatta E, Abecasis GR. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet* 3: e115, 2007.

Sharma AM. The obese patient with diabetes mellitus: from research targets to treatment options. *Am J Med* 119: S17–23, 2006.

Sjostrom L, Lindroos A-K, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, Dahlgren S, Larsson B, Narbro K, Sjostrom CD, Sullivan M, Wedel H. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med* 351: 2683–2693, 2004.

Smemo S, Tena JJ, Kim K-H, Gamazon ER, Sakabe NJ, Gomez-Marin C, Aneas I, Credidio FL, Sobreira DR, Wasserman NF, Lee JH, Puviindran V, Tam D, Shen M, Son JE, Vakili NA, Sung H-K, Naranjo S, Acemel RD, Manzanares M, Nagy A, Cox NJ, Hui C-C, Gomez-Skarmeta JL, Nobrega MA. Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature* 507: 371–375, 2014.

Sovio U, Mook-Kanamori DO, Warrington NM, Lawrence R, Briollais L, Palmer CNA, Cecil J, Sandling JK, Syvanen A-C, Kaakinen M, Beilin LJ, Millwood IY, Bennett AJ, Laitinen J, Pouta A, Molitor J, Davey Smith G, Ben-Shlomo Y, Jaddoe VW V, Palmer LJ, Pennell CE, Cole TJ, McCarthy MI, Jarvelin M-R, Timpson NJ. Association between common variation at the FTO locus and changes in body mass index from infancy to late childhood: the complex nature of genetic association through growth and development. *PLoS Genet* 7: e1001307, 2011.

Speakman JR, Rance KA, Johnstone AM. Polymorphisms of the FTO gene are associated with variation in energy intake, but not energy expenditure. *Obesity (Silver Spring)* 16: 1961–1965, 2008.

Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, Lango Allen H, Lindgren CM, Luan J, Magi R, Randall JC, Vedantam S, Winkler TW, Qi L, Workalemahu T, Heid IM, Steinthorsdottir V, Stringham HM, Weedon MN, Wheeler E, Wood AR, Ferreira T, Weyant RJ, Segre A V, Estrada K, Liang L, Nemesh J, Park J-H, Gustafsson S, Kilpelainen TO, Yang J, Bouatia-Naji N, Esko T, Feitosa MF, Kutalik Z, Mangino M, Raychaudhuri S, Scherag A, Smith AV, Welch R, Zhao JH, Aben KK, Absher DM, Amin N, Dixon AL, Fisher E, Glazer NL, Goddard ME, Heard-Costa NL, Hoesel V, Hottenga J-J, Johansson A, Johnson T, Ketkar S, Lamina C, Li S, Moffatt MF, Myers RH, Narisu N, Perry JRB, Peters MJ, Preuss M, Ripatti S, Rivadeneira F, Sandholt C, Scott LJ, Timpson NJ, Tyrer JP, van Wingerden S, Watanabe RM, White CC, Wiklund F, Barlassina C, Chasman DI, Cooper MN, Jansson J-O, Lawrence RW, Pellikka N, Prokopenko I, Shi J, Thiering E, Alavere H, Alibrandi MTS, Almgren P, Arnold AM, Aspelund T, Atwood LD, Balkau B, Balmforth AJ, Bennett AJ, Ben-Shlomo Y, Bergman RN, Bergmann S, Biebermann H, Blakemore AIF, Boes T, Bonnycastle LL, Bornstein SR, Brown MJ, Buchanan TA, Busonero F, Campbell H, Cappuccio FP, Cavalcanti-Proenca C, Chen Y-DI,

Chen C-M, Chines PS, Clarke R, Coin L, Connell J, Day INM, den Heijer M, Duan J, Ebrahim S, Elliott P, Elosua R, Eiriksdottir G, Erdos MR, Eriksson JG, Facheris MF, Felix SB, Fischer-Posovszky P, Folsom AR, Friedrich N, Freimer NB, Fu M, Gaget S, Gejman P V, Geus EJC, Gieger C, Gjesing AP, Goel A, Goyette P, Grallert H, Grassler J, Greenawalt DM, Groves CJ, Gudnason V, Guiducci C, Hartikainen A-L, Hassanali N, Hall AS, Havulinna AS, Hayward C, Heath AC, Hengstenberg C, Hicks AA, Hinney A, Hofman A, Homuth G, Hui J, Igl W, Iribarren C, Isomaa B, Jacobs KB, Jarick I, Jewell E, John U, Jorgensen T, Jousilahti P, Jula A, Kaakinen M, Kajantie E, Kaplan LM, Kathiresan S, Kettunen J, Kinnunen L, Knowles JW, Kolcic I, Konig IR, Koskinen S, Kovacs P, Kuusisto J, Kraft P, Kvaloy K, Laitinen J, Lantieri O, Lanzani C, Launer LJ, Lecoeur C, Lehtimaki T, Lettre G, Liu J, Lokki M-L, Lorentzon M, Luben RN, Ludwig B, Manunta P, Marek D, Marre M, Martin NG, McArdle WL, McCarthy A, McKnight B, Meitinger T, Melander O, Meyre D, Midthjell K, Montgomery GW, Morken MA, Morris AP, Mulic R, Ngwa JS, Nelis M, Neville MJ, Nyholt DR, O'Donnell CJ, O'Rahilly S, Ong KK, Oostra B, Pare G, Parker AN, Perola M, Pichler I, Pietilainen KH, Platou CGP, Polasek O, Pouta A, Rafelt S, Raitakari O, Rayner NW, Ridderstrale M, Rief W, Ruokonen A, Robertson NR, Rzehak P, Salomaa V, Sanders AR, Sandhu MS, Sanna S, Saramies J, Savolainen MJ, Scherag S, Schipf S, Schreiber S, Schunkert H, Silander K, Sinisalo J, Siscovick DS, Smit JH, Soranzo N, Sovio U, Stephens J, Surakka I, Swift AJ, Tammesoo M-L, Tardif J-C, Teder-Laving M, Teslovich TM, Thompson JR, Thomson B, Tonjes A, Tuomi T, van Meurs JBJ, van Ommen G-J, Vatin V, Viikari J, Visvikis-Siest S, Vitart V, Vogel CIG, Voight BF, Waite LL, Wallaschofski H, Walters GB, Widen E, Wiegand S, Wild SH, Willemsen G, Witte DR, Witteman JC, Xu J, Zhang Q, Zgaga L, Ziegler A, Zitting P, Beilby JP, Farooqi IS, Hebebrand J, Huikuri H V, James AL, Kahonen M, Levinson DF, Macciardi F, Nieminen MS, Ohlsson C, Palmer LJ, Ridker PM, Stumvoll M, Beckmann JS, Boeing H, Boerwinkle E, Boomsma DI, Caulfield MJ, Chanock SJ, Collins FS, Cupples LA, Smith GD, Erdmann J, Froguel P, Gronberg H, Gyllensten U, Hall P, Hansen T, Harris TB, Hattersley AT, Hayes RB, Heinrich J, Hu FB, Hveem K, Illig T, Jarvelin M-R, Kaprio J, Karpe F, Khaw K-T, Kiemeney LA, Krude H, Laakso M, Lawlor DA, Metspalu A, Munroe PB, Ouwehand WH, Pedersen O, Penninx BW, Peters A, Pramstaller PP, Quertermous T, Reinehr T, Rissanen A, Rudan I, Samani NJ, Schwarz PEH, Shuldiner AR, Spector TD, Tuomilehto J, Uda M, Uitterlinden A, Valle TT, Wabitsch M, Waeber G, Wareham NJ, Watkins H, Wilson JF, Wright AF, Zillikens MC, Chatterjee N, McCarroll SA, Purcell S, Schadt EE, Visscher PM, Assimes TL, Borecki IB, Deloukas P, Fox CS, Groop LC, Haritunians T, Hunter DJ, Kaplan RC, Mohlke KL, O'Connell JR, Peltonen L, Schlessinger D, Strachan DP, van Duijn CM, Wichmann H-E, Frayling TM, Thorsteinsdottir U, Abecasis GR, Barroso I, Boehnke M, Stefansson K, North KE, McCarthy MI, Hirschhorn JN, Ingelsson E, Loos RJF. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet* 42: 937–948, 2010.

Stratigopoulos G, Padilla SL, LeDuc CA, Watson E, Hattersley AT, McCarthy MI, Zeltser LM, Chung WK, Leibel RL. Regulation of Fto/Ftm gene expression in mice and humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1185–96, 2008.

Suzuki A, Lindor K, St Saver J, Lymp J, Mendes F, Muto A, Okada T, Angulo P. Effect of changes on body weight and lifestyle in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 43: 1060–1066, 2005.

Thomson CC, Clark S, Camargo CAJ. Body mass index and asthma severity among adults presenting to the emergency department. *Chest* 124: 795–802, 2003.

Tsai F, Coyle WJ. The microbiome and obesity: is obesity linked to our gut flora? *Curr Gastroenterol Rep* 11: 307–313, 2009.

Tung Y-CL, Ayuso E, Shan X, Bosch F, O'Rahilly S, Coll AP, Yeo GSH. Hypothalamic-specific manipulation of Fto, the ortholog of the human obesity gene FTO, affects food intake in rats. *PLoS One* 5: e8771, 2010.

Wahlen K, Sjolin E, Hoffstedt J. The common rs9939609 gene variant of the fat mass- and obesity-associated gene FTO is related to fat cell lipolysis. *J Lipid Res* 49: 607–611, 2008.

Wu Q, Saunders RA, Szkudlarek-Mikho M, Serna I de la, Chin K-V. The obesity-associated Fto gene is a transcriptional coactivator. *Biochem Biophys Res Commun* 401: 390–395, 2010.

Yang J, Manolio TA, Pasquale LR, Boerwinkle E, Caporaso N, Cunningham JM, de Andrade M, Feenstra B, Feingold E, Hayes MG, Hill WG, Landi MT, Alonso A, Lettre G, Lin P, Ling H, Lowe W, Mathias RA, Melbye M, Pugh E, Cornelis MC, Weir BS, Goddard ME, Visscher PM. Genome partitioning of genetic variation for complex traits using common SNPs. *Nat Genet* 43: 519–525, 2011.

Yang R, Mao S, Zhang S, Li R, Zhao Z. Prevalence of obesity and overweight among Chinese children with attention deficit hyperactivity disorder: a survey in Zhejiang Province, China. *BMC Psychiatry* 13: 133, 2013.

Zabena C, Gonzalez-Sanchez JL, Martinez-Larrad MT, Torres-Garcia A, Alvarez-Fernandez-Represa J, Corbaton-Anchuelo A, Perez-Barba M, Serrano-Rios M. The FTO obesity gene. Genotyping and gene expression analysis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 19: 87–95, 2009.

Zbikowski SM, Jack LM, McClure JB, Deprey M, Javitz HS, McAfee TA, Catz SL, Richards J, Bush T, Swan GE. Utilization of services in a randomized trial testing phone- and web-based interventions for smoking cessation. *Nicotine Tob Res* 13: 319–327, 2011.

Zhang G, Karns R, Narancic NS, Sun G, Cheng H, Missoni S, Durakovic Z, Rudan P, Chakraborty R, Deka R. Common SNPs in FTO gene are associated with obesity related anthropometric traits in an island population from the eastern Adriatic coast of Croatia. *PLoS One* 5: e10375, 2010.

Zheng W, Zhang B, Cai Q, Sung H, Michailidou K, Shi J, Choi J-Y, Long J, Dennis J, Humphreys MK, Wang Q, Lu W, Gao Y-T, Li C, Cai H, Park SK, Yoo K-Y, Noh D-Y, Han W, Dunning AM, Benitez J, Vincent D, Bacot F, Tessier D, Kim S-W, Lee MH, Lee JW, Lee J-Y, Xiang Y-B, Zheng Y, Wang W, Ji B-T, Matsuo K, Ito H, Iwata H, Tanaka H, Wu AH, Tseng C, Van Den Berg D, Stram DO, Teo SH, Yip CH, Kang IN, Wong TY, Shen C-Y, Yu J-C, Huang C-S, Hou M-F, Hartman M, Miao H, Lee SC, Putti TC, Muir K, Lophatananon A, Stewart-Brown S, Siriwanarangsan P, Sangrajrang S, Shen H, Chen K, Wu P-E, Ren Z, Haiman CA, Sueta A, Kim MK, Khoo US, Iwasaki M, Pharoah PDP, Wen W, Hall P, Shu X-O, Easton DF, Kang D. Common genetic determinants of breast-cancer risk in East Asian women: a collaborative study of 23 637 breast cancer cases and 25 579 controls. *Hum Mol Genet* 22: 2539–2550, 2013.

Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. Switzerland: 2000.

Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285: 2486–2497, 2001.

https://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/maldi-biotyper/overview.html
http://www.dnalink.com/korean/service/taqman.html
http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm
http://www.had2know.com/academics/hardy-weinberg-equilibrium-calculator-2-alleles.html
http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml
http://www.zzjzpgz.hr/nzl/71/debljina.htm

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 2. lipnja 1991. godine u Zadru. Prvih šest razreda išla sam u Osnovnu školu Petra Lorinija u Salima na Dugom otoku, a ostala dva razreda išla sam u Osnovnu školu Petra Preradovića u Zadru. Pohađala sam prirodoslovno-matematički smjer Gimnazije Jurja Barakovića u Zadru. 2010. godine upisala sam preddiplomski studij molekularne biologije u Zagrebu, a 2013. godine i diplomski studij molekularne biologije. Za vrijeme studiranja sudjelovala sam u manifestaciji Noć biologije za što sam dobila i posebnu Rektorovu nagradu te sam prisustvovala 1. Hrvatskom simpoziju biologa u zdravstvu.

Dobro se služim engleskim jezikom,a njemački jezik poznajem na osnovnoj razini. Kako sam od malih nogu uključena u rad s turistima, posjedujem dobre komunikacijske i organizacijske vještine. U slobodno vrijeme pohađam tečajeve tanga te klasičnog i latinoameričkog plesa.