

# Polimorfizmi gena za apolipoprotein A5 i protein-nosač masnih kiselina 2 u metaboličkom sindromu starije populacije

---

Feher Turković, Lana

Doctoral thesis / Disertacija

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:437376>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Lana Feher Turković

**POLIMORFIZMI GENA ZA  
APOLIPOPROTEIN A5 I  
PROTEIN-NOSAČ MASNIH KISELINA 2  
U METABOLIČKOM SINDROMU  
STARIJE POPULACIJE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.





University of Zagreb  
FACULTY OF SCIENCE

Lana Feher Turković

**GENE POLYMORPHISMS OF THE  
APOLIPOPROTEIN A5 AND  
THE FATTY ACID-BINDING PROTEIN 2  
IN THE METABOLIC SYNDROME  
OF THE ELDERLY SUBJECTS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016.





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Lana Feher Turković

**POLIMORFIZMI GENA ZA  
APOLIPOPROTEIN A5 I  
PROTEIN-NOSAČ MASNIH KISELINA 2  
U METABOLIČKOM SINDROMU  
STARIJE POPULACIJE**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Daria Pašalić

Zagreb, 2016.





University of Zagreb  
FACULTY OF SCIENCE

Lana Feher Turković

**GENE POLYMORPHISMS OF THE  
APOLIPOPROTEIN A5 AND  
THE FATTY ACID-BINDING PROTEIN 2  
IN THE METABOLIC SYNDROME  
OF THE ELDERLY SUBJECTS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Daria Pašalić, PhD. Associate Professor

Zagreb, 2016.





## ZAHVALE

Prof. dr. sc. Dariji Pašalić, mentorici koja me strpljivo usmjeravala i savjetovala tijekom eksperimentalnog istraživanja i pisanja disertacije, dugujem svoju najveću, duboku zahvalnost. Njena etičnost, znanje i mudrost stalan su poticaj na preispitivanje i težnju k tome da budem što bolja u svim segmentima djelovanja.

Iskreno zahvaljujem doc. dr. sc. Jasmini Rokov Plavec i izv. prof. dr. sc. Domagoju Đikić - članovima povjerenstva za ocjenu rada - na sugestijama i ispravkama kako bi disertacija bila što bolja.

Pročelnici Zavoda za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prof. dr. sc. Jasni Lovrić, koja mi je omogućila rad u prostoru Zavoda, najsrdačnije zahvaljujem na gostoprimstvu.

Od srca hvala poštovanoj prof. dr. sc. Ivančici Delaš na svim savjetima i povjerenju koje mi je ukazala omogućivši mi rad na plinskom kromatografu. Zahvaljujem i drugim djelatnicima Zavoda za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta koji su mi na bilo koji način pomogli u radu i bili iznimna podrška dugi niz godina.

U mislima beskrajno zahvaljujem dragoj gospođi Ani Čačić na nesebičnoj pomoći pri radu u laboratoriju, koja na žalost nije dočekala trenutak završetka izrade disertacije – draga Ana, nadam se da ste ponosni i da ponekad spustite pogled na nas!

Zahvaljujem Zdravstvenom veleučilištu na financijskoj pomoći bez koje provedba istraživanja ne bi bila moguća. Djelatnicima Zdravstvenog veleučilišta zahvaljujem na poticaju i riječima ohrabrenja. Posebnu zahvalnost od srca upućujem kolegama Ivici Kostrecu i Ozrenu Digula.

Veliko hvala na bodrenju i bezuvjetnoj podršci mojim dragim prijateljicama koje su uvijek tu kada ih trebam – Ana, Tanja, Mirna, Edina, Vjeročka, Morana - hvala.

Hvala najbližima koji bez zadržke vjeruju u mene: mami – čije me geslo: „Sve što započneš, MORAŠ završiti!“ i energičnost usmjeravaju kroz život i vode prema ciljevima; tati - uvijek nenametljivom i na raspolaganju; Lauri - na odanoj sestrinskoj podršci kroz život.

Na kraju, ali nikako manje važno, od srca hvala mom suprugu Kreši, najvećem kritičaru s najboljom namjerom.

*Klari i Jani, jer svemu u mom životu daju smisao.*

*Bakama i djedu koji više nisu sa mnom i kojima bi ova disertacija najviše značila - nadahnjuju me i dalje, u mom srcu zauvijek.*



## Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>X</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. METABOLIČKI SINDROM.....</b>	<b>3</b>
2.1.1. <i>DEFINICIJE METABOLIČKOG SINDROMA</i> .....	4
2.1.2. <i>EPIDEMIOLOGIJA METABOLIČKOG SINDROMA</i> .....	7
2.1.3. <i>PATOFIZIOLOGIJA METABOLIČKOG SINDROMA</i> .....	9
2.1.3.1. <i>ABDOMINALNA PRETILOST</i> .....	12
2.1.3.2. <i>SLOBODNE MASNE KISELINE</i> .....	14
2.1.3.3. <i>INZULINSKA REZISTENCIJA</i> .....	15
2.1.3.4. <i>DISLIPIDEMIJA</i> .....	18
2.1.3.5. <i>HIPERTENZIJA</i> .....	19
2.1.3.6. <i>ISHRANA</i> .....	19
2.1.3.7. <i>GENETIČKE PREDISPOZICIJE</i> .....	19
2.1.3.8. <i>OSTALI ČIMBENICI</i> .....	23
2.1.3.8.1. <i>ENDOTELNA FUNKCIJA</i> .....	23
2.1.3.8.2. <i>C-REAKTIVNI PROTEIN (CRP)</i> .....	24
2.1.3.8.3. <i>HIPERKOAGULACIJSKO STANJE</i> .....	25
2.1.3.8.4. <i>ADIPONEKTIN</i> .....	26
2.1.3.8.5. <i>LEPTIN</i> .....	27
2.1.3.8.6. <i>INTERLEUKIN-6 (IL-6)</i> .....	27
2.1.3.8.7. <i>INTERLEUKIN-10 (IL-10)</i> .....	28
2.1.3.8.8. <i>INHIBITOR-1 AKTIVATORA PLAZMINOGENA (PAI-1)</i> .....	28
2.1.3.8.9. <i>ČIMBENIK NEKROZE TUMORA <math>\alpha</math> (TNF<math>\alpha</math>)</i> .....	30
2.1.3.8.10. <i>GRELIN</i> .....	31
2.1.3.8.11. <i>MOKRAĆNA KISELINA</i> .....	31
2.1.3.8.12. <i>OKSIDIRANI LIPOPROTEINI NISKE GUSTOĆE (oxLDL)</i> .....	33
2.1.3.8.13. <i>PARAOKSONAZA-1 (PON-1)</i> .....	34
<b>2.2. LIPOPROTEINI .....</b>	<b>35</b>
2.2.1. <i>APOLIPOPROTEINI (APOPROTEINI)</i> .....	37
2.2.1.2. <i>STRUKTURA GENA APOA5 I LOKACIJA POLIMORFIZAMA</i> .....	39
2.2.1.2.1. <i>REGULACIJA GENA APOA5</i> .....	41

2.2.1.3. STRUKTURA APOLIPOPOTEINA A5 .....	42
2.2.1.4. MEHANIZAM DJELOVANJA APOLIPOPOTEINA A5 .....	45
2.2.1.5. APOLIPOPOTEIN A5 U KARDIOMETABOLIČKIM BOLESTIMA .....	47
2.2.1.5.1. KARDIOVASKULARNE BOLESTI .....	48
2.2.1.5.2. POVEZANOST SNP-ova ZA ApoA5 S METABOLIČKIM SINDROMOM.....	49
<b>2.3. PROTEINI-NOSAČI LIPIDA .....</b>	<b>51</b>
2.3.1. PROTEINI-NOSAČI MASNIH KISELINA .....	52
2.3.1.1. PROTEIN-NOSAČ MASNIH KISELINA 2 (FABP2).....	56
2.3.2. STRUKTURA GENA FABP2.....	58
2.3.3. POLIMORFIZMI FABP2 I METABOLIČKI SINDROM .....	58
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>60</b>
<b>3.1. ISPITANICI .....</b>	<b>60</b>
<b>3.2. UZORCI.....</b>	<b>61</b>
3.2.1. BIOKEMIJSKE ANALIZE.....	61
<b>3.3. POSTUPCI U ANALIZI POLIMORFIZAMA U GENOMSKOJ DNA .....</b>	<b>62</b>
3.3.1. IZOLACIJA DNA IZ PUNE KRVI.....	62
3.3.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE DNA .....	64
3.3.3. ISPITIVANJE KVALITETE IZOLIRANE DNA .....	65
3.3.4. METODE GENOTIPIZACIJE.....	67
3.3.4.1. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM .....	67
3.3.4.2. PROVJERA USPJEŠNOSTI UMNAŽANJA ULOMAKA DNA .....	70
3.3.4.3. POLIMORFIZAM DULJINE RESTRIKCIJSKIH ULOMAKA DNA.....	72
3.3.4.3.1. RAZGRADNJA ULOMAKA DNA S POLIMORFIZMOM SNP1 .....	72
3.3.4.3.2. RAZGRADNJA ULOMAKA DNA S POLIMORFIZMOM SNP3 .....	73
3.3.4.3.3. RAZGRADNJA ULOMAKA DNA S POLIMORFIZMOM S19W .....	73
3.3.4.3.4. RAZGRADNJA ULOMAKA DNA S POLIMORFIZMOM FABP2.....	74
3.3.4.4. DETEKCIJA POLIMORFIZAMA SNP1, SNP3, S19W i FABP2 .....	75
3.3.4.4.1. DETEKCIJA POLIMORFIZMA SNP1.....	75
3.3.4.4.2. DETEKCIJA POLIMORFIZMA SNP3.....	76
3.3.4.4.3. DETEKCIJA POLIMORFIZMA S19W.....	80
3.3.4.4.4. DETEKCIJA POLIMORFIZMA FABP2.....	80
<b>3.4. EKSTRAKCIJA UKUPNIH LIPIDA IZ SERUMA I PRIPREMA METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA .....</b>	<b>80</b>
<b>3.5. PLINSKA KROMATOGRAFIJA.....</b>	<b>82</b>
<b>3.6. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA .....</b>	<b>83</b>
<b>§ 4. REZULTATI.....</b>	<b>85</b>

---

4.1.	OSNOVNE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA OBZIROM NA PRISUTNOST METABLIČKOG SINDROMA .....	85
4.2.	POLIMORFIZAM <i>SNP1</i> GENA <i>ApoA5</i> .....	87
4.3.	POLIMORFIZAM <i>SNP3</i> GENA <i>ApoA5</i> .....	88
4.4.	POLIMORFIZAM <i>S19W</i> GENA <i>ApoA5</i> .....	90
4.5.	POLIMORFIZAM GENA <i>FABP2</i> .....	92
4.6.	GENOTIPOVI I FREKVENCije ALELA U GRUPAMA ISPITANIKA MetS(+) i MetS(-) ZA TRI GENske VARIJANTE <i>ApoA5</i> .....	94
4.7.	GENOTIPOVI I FREKVENCije ALELA U GRUPAMA ISPITANIKA MetS(+) i MetS(-) ZA GENske VARIJANTE <i>FABP2</i> .....	99
4.8.	BIOKEMIJSKE I ANTROPOMETRIJSKE VRIJEDNOSTI U ISPITANIKA MetS(+) i MetS(-) OBZIROM NA <i>FABP2 Ala54Thr</i> POLIMORFIZAM.....	100
4.9.	SASTAV I KONCENTRACIJE MASNIH KISELINA U GRUPAMA ISPITANIKA MetS(+) i MetS(-).....	103
4.10.	POVEZANOST SASTAVA I KONCENTRACIJA MASNIH KISELINA S GENSKIM VARIJANTAMA <i>ApoA5</i> U GRUPI ISPITANIKA MetS+ .....	105
4.11.	POVEZANOST SASTAVA MASNIH KISELINA I GENSKIH VARIJANTI <i>FABP2</i> U GRUPI ISPITANIKA MetS+ .....	108
§ 5.	<b>RASPRAVA</b> .....	109
5.1.	POLIMORFIZMI JEDNOG NUKLEOTIDA ZA <i>ApoA5</i> .....	109
5.2.	POLIMORFIZAM JEDNOG NUKLEOTIDA ZA <i>FABP2</i> .....	111
5.3.	POVEZANOST POLIMORFIZAMA <i>ApoA5</i> I <i>FABP2</i> SA SASTAVOM I KONCENTRACIJAMA MASNIH KISELINA U UKUPNIM LIPIDIMA PLAZME ISPITANIKA.....	112
5.4.	PREDNOSTI I NEDOSTACI ISTRAŽIVANJA .....	114
§ 6.	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	115
§ 7.	<b>POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA</b> .....	117
§ 8.	<b>LITERATURNI IZVORI</b> .....	120
§ 9.	<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	XI





Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Doktorska disertacija

## SAŽETAK

### POLIMORFIZMI GENA ZA APOLIPOPROTEIN A5 I PROTEIN-NOSAČ MASNIH KISELINA 2 U METABOLIČKOM SINDROMU STARIJE POPULACIJE

Lana Feher Turković  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Šalata 3, Zagreb

Metabolički sindrom (MetS) je poremećaj za čiji razvoj je odgovoran cijeli niz čimbenika kao što su dislipidemija, abdominalna pretilost, hipertenzija i hiperglikemija. U čimbenike rizika ubrajaju se i genetički čimbenici. Kako bi se utvrdilo da li promjene u strukturi gena za apolipoprotein A5 (ApoA5) i protein-nosač masnih kiselina 2 (FABP2) koji sudjeluju u izvanstaničnom/unutarstaničnom transportu lipida utječu na nastanak MetS u starijoj populaciji, provedeno je istraživanje na 345 ispitanika muškog i ženskog spola starosti od 70 do 93 godine. Za svakog su ispitanika utvrđene antropometrijske vrijednosti, a biokemijskim su analizama određeni parametri lipidnog statusa u serumu, kao i koncentracija glukoze, ukupni proteini i C-reaktivni protein. Genotipizacija odabranih gena provedena je metodama temeljenim na lančanoj reakciji polimerazom. Plinskom kromatografijom određen je sastav i koncentracije masnih kiselina u ispitanika s i bez MetS. Statističkom je analizom utvrđeno da genske varijante gena za ApoA5 i gena za FABP2 nisu povezane s povećanim rizikom za razvoj metaboličkog sindroma. Međutim, polimorfizmi gena za ApoA5 i gena za FABP2 mogu biti povezani s koncentracijama lipida u serumu starije populacije s metaboličkim sindromom. Zaključak je da bi se stoga ApoA5 i FABP2 mogli razmotriti kao čimbenici patobiokemije multifaktorijskih poremećaja poput MetS.

(151 stranica, 35 slika, 20 tablica, 300 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: ApoA5/FABP2/metabolički sindrom/polimorfizmi gena

Mentor: izv. prof. dr. sc. Daria Pašalić

Rad prihvaćen: 30. studeni 2016.godine

Ocjenitelji:

1. Doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
2. Izv. prof. dr. sc. Daria Pašalić
3. Izv. prof. dr. sc. Domagoj Đikić







University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Doctoral Thesis

## ABSTRACT

### GENE POLYMORPHISMS OF THE APOLIPOPROTEIN A5 AND THE FATTY ACID-BINDING PROTEIN 2 IN THE METABOLIC SYNDROME OF THE ELDERLY SUBJECTS

Lana Feher Turković  
University of Zagreb, School of Medicine, Šalata 3, Zagreb

Metabolic syndrome (MetS) is a multifactorial disorder. Among the risk factors for developing MetS are dyslipidemia, abdominal obesity, hypertension and hyperglycemia. The other risk factors include also the genetic factors. To determine whether changes in the structure of the gene for apolipoprotein A5 (ApoA5) and the fatty acid-binding protein 2 (FABP2), that participate in the extracellular / intracellular transport of lipids influence the occurrence of MetS in older population, an investigation was conducted on 345 subjects, males and females, aged 70-93 years. For each subject were determined the anthropometric values. The concentrations of glucose, total protein and C-reactive protein were determined in serum by biochemical methods. Genotyping of selected genes was carried out by methods based on the polymerase chain reaction. The composition and concentration of fatty acids in subjects with and without MetS were determined by gas chromatography. Statistical analysis showed that genetic variants of ApoA5 gene and FABP2 gene were not associated with an increased risk for developing metabolic syndrome. However, ApoA5 and FABP2 gene polymorphisms may be associated with serum lipid levels in an elderly population with MetS. The conclusion is that the ApoA5 and FABP2 could be considered as factors for pathobiochemistry of multifactorial disorders such as MetS.

(151 pages, 35 figures, 20 tables, 300 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: ApoA5/FABP2/metabolic syndrome/gene polymorphisms/

Supervisor: Prof. Daria Pašalić, PhD

Thesis accepted: 30th November 2016

Reviewers:

1. Asst. Prof. Jasmina Rokov Plavec, PhD
2. Prof. Daria Pašalić, PhD
3. Prof. Domagoj Đikić, PhD



## § 1. UVOD

Metabolički sindrom čini skup međusobno povezanih biokemijskih, fizioloških, kliničkih i metaboličkih čimbenika koji izravno povećavaju rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti i šećerne bolesti tipa 2. Inzulinska rezistencija, visceralna pretilost, aterogena dislipidemija, endotelna disfunkcija, povišen krvni tlak, hiperkoagulacijsko stanje, genetičko nasljeđe i kronični stres dio su čimbenika koji čine sindrom.

Mnogi bi polimorfizmi u deoksiribonukleinskoj kiselini (DNA) mogli biti umiješani u nastanak metaboličkog sindroma. Apolipoprotein A5 (ApoA5) je proteinska komponenta lipoproteinskih čestica bogatih triacilglicerolima, hilomikrona i lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL), kao i lipoproteina visoke gustoće (HDL). Gen *APOA5* smješten je proksimalno skupini gena za apolipoproteine na kromosomu 11q23. Istraživanja provedena posljednjih desetak godina povezuju polimorfizme gena *APOA5* s metaboličkim sindromom, koronarnom bolesti srca i cerebrovaskularnim poremećajima. Polimorfizmi jednog nukleotida *SNP 1 – T1259C*, *SNP 3 – T1131C* i *S19W – C56G* pojedinačno ili udruženo s drugim genima reguliraju koncentraciju triacilglicerola u serumu.

Proteini koji vežu lipide imaju ulogu u signalizaciji, membranskom transportu, regulaciji, imunom odgovoru, te metabolizmu i transportu lipida. Protein-nosač masnih kiselina 2 (FABP2) pripada skupini proteina koji vežu lipide i jedan je od devet različitih, do sada identificiranih, protein-nosača masnih kiselina u sisavaca. Osnovna uloga svih proteina ove skupine je regulacija vezanja i transporta masnih kiselina. FABP2 ima dva oblika koji se razlikuju u vezanju i transportu masnih kiselina kroz stanice: protein može sadržavati alanin (Ala) ili treonin (Thr) na položaju 54. Geni koji kodiraju za proteine FABP raspršeni su u genomu, a njihova je struktura dobro očuvana. Svaki se gen sastoji od 4 egzona koje odjeljuju tri introna varijabilnih duljina. Gen *FABP2* kodira za protein FABP2. Sastoji se od 3382 nukleotida smještenih u kromosomskoj regiji 4q28-4q31. Polimorfizam je povezan s tranzicijom iz G u A na kodonu 54 gena *FABP2*, što rezultira supstitucijom alanina (Ala) treoninom (Thr) u egzonu 2. Protein koji sadrži Thr ima veću sposobnost transportiranja dugolančanih masnih kiselina od proteina koji sadrži Ala.

Pretpostavka je da bi polimorfizmi gena za apolipoprotein A5 i protein-nosač masnih kiselina 2 mogli biti umiješani u patogenezu metaboličkog sindroma kao njegove

---

dislipidemične komponente, budući da su apolipoprotein A5 (ApoA5) i protein-nosač masnih kiselina 2 (FABP2) uključeni u transport lipida.

Cilj istraživanja bio je istražiti povezanost genetičkih polimorfizama gena *APOA5* i *FABP2* s metaboličkim sindromom, njegovim biokemijskim i antropološkim parametrima kod starije populacije u nekoliko gradova Republike Hrvatske, te usporediti rezultate s rezultatima istraživanja provedenih u populacijskim skupinama drugih zemalja. U tu svrhu genotipizirana su tri česta polimorfizma gena *ApoA5* (*SNP1*, *SNP3* i *S19W*) i jedan polimorfizam gena *FABP2*, te su provedene biokemijske analize krvi i određen je lipidni status ispitanika.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. METABOLIČKI SINDROM

Prvi opis pacijenata sa skupinom različitih metaboličkih poremećaja potječe još iz 1923. godine u kojoj Kylin povezuje visoki krvni tlak (hipertenziju), povišenu koncentraciju glukoze u plazmi (hiperglicemiju) i giht.<sup>1</sup> Vague 1947. godine zaključuje da je visceralna (abdominalna) pretilost često povezana s metaboličkim poremećajima otkrivenim u kardiovaskularnim aterosklerotskim bolestima (CVD, *engl. cardiovascular atherosclerotic diseases*) i šećernoj bolesti tipa 2 (diabetes mellitus tip 2; T2DM, *engl. diabetes mellitus type 2*).<sup>2</sup> Reaven 1988. godine ovaj konglomerat različitih metaboličkih poremećaja objedinjuje u skupinu koju naziva „sindrom X“,<sup>3</sup> danas poznat pod nazivom metabolički sindrom (MetS). Njegov glavni doprinos bio je uvođenje koncepta inzulinske rezistencije, ali propustio je uvrstiti pretilost ili visceralnu pretilost u definiciju sindroma X, što je kasnije pridodano kao presudni čimbenik. Kaplan je 1989. godine preimenovao sindrom u „Smrtonosni kvartet“ radi kombinacije pretilosti gornjeg dijela tijela, intolerancije glukoze, hipertrigliceridemije i hipertenzije,<sup>4</sup> ali 1992. godine naziv sindroma se ponovno mijenja, ovoga puta u Sindrom inzulinske rezistencije.<sup>5</sup> Tijekom posljednjih dvadeset godina, različite su organizacije i udruge predlagale različite definicije, i koristile različitu terminologiju.<sup>6</sup>

Metabolički sindrom je stanje koje podrazumijeva niz zdravstvenih rizika i predstavlja globalni zdravstveni problem. Rizik za njegov nastanak izravno povećavaju međusobno povezani biokemijski, fiziološki, metabolički i klinički čimbenici, koji izravno povisuju rizik za koronarnu bolest srca (CHD, *engl. coronary heart disease*), druge oblike kardiovaskularnih aterosklerotskih bolesti i šećernu bolest tipa 2.

Najznačajniji čimbenici rizika za razvoj metaboličkog sindroma su abdominalna pretilost (širok opseg struka, tj. tijelo u obliku jabuke; višak masnog tkiva u predjelu struka veći je čimbenik rizika za koronarnu bolest srca od viška masnog tkiva u drugim dijelovima tijela), hipertenzija, hiperglicemija, intolerancija glukoze, dislipidemija (niža koncentracija kolesterola u lipoproteinima visoke gustoće (HDL-C), povišena koncentracija lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL) i visoka koncentracija triacilglicerola u krvi te rezistencija na inzulin), endotelna disfunkcija, genetički čimbenici, kroničan stres kao i loše životne navike.<sup>7</sup> Izraz

„metabolički“ u nazivu odnosi se na biokemijske procese uključene u normalno funkcioniranje organizma. Promjenom životnih navika moguće je utjecati na dio rizičnih čimbenika kao što su pretilost, rezistencija na inzulin, neaktivni stil života, prehrana, pušenje i konzumacija alkohola, ali nije moguće utjecati na sve čimbenike, kao što je primjerice starenje.

### 2.1.1. DEFINICIJE METABOLIČKOG SINDROMA

Grupa za dijabetes Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, *engl. World Health Organization*) prva je pokušala odrediti definiciju metaboličkog sindroma 1998. godine.<sup>8</sup> Europska grupa za istraživanje inzulinske rezistencije (EGIR, *engl. The European Group for the study of Insulin Resistance*) mijenja definiciju Svjetske zdravstvene organizacije 1999. godine.<sup>9</sup> Godine 2001. Nacionalni program obrazovanja o kolesterolu, Panel o liječenju odraslih III (NCEP-ATP III; *engl. The National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III*) objavljuje svoju definiciju.<sup>10</sup> Američko udruženje kliničkih endokrinologa (AACE, *engl. American Association of Clinical Endocrinologists*) 2003. godine nudi svoje mišljenje s obzirom na definiciju sindroma.<sup>11</sup> Umnožavanje definicija pokazalo je da je poželjna jedna ujedinjujuća definicija, pa je u tu svrhu Međunarodno udruženje za dijabetes (IDF, *engl. International Diabetes Federation*) 2005. godine predložilo novu definiciju metaboličkog sindroma.<sup>12</sup>

Definicije metaboličkog sindroma prema prijedlozima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), Nacionalnog programa obrazovanja o kolesterolu u SAD-u (NCEP), Američkog udruženja kliničkih endokrinologa (AACE) i Međunarodnog udruženja za dijabetes (IDF) prikazane su u Tablici 1.

Svjetska zdravstvena organizacija metabolički sindrom definira kao intoleranciju glukoze, smanjenu toleranciju glukoze (IGT) ili šećernu bolest (diabetes mellitus) i/ili rezistenciju na inzulin, zajedno s dvije ili više komponenti koje uključuju povišen arterijski tlak, povišenu koncentraciju triacilglicerola u krvi i snižen HDL-kolesterol, povišen indeks tjelesne mase ITM i mikroalbuminuriju (Tablica 1).

Ova definicija inzistirala je na jasnem opisu esencijalnih komponenti sindroma, zajedno s podacima koji bi podržavali relativni značaj svake komponente. Ti parametri trebali bi biti na visokoj tehničkoj razini i pokazali su se neprovedivima.<sup>13</sup>

Tablica 1. Definicije metaboličkog sindroma prema prijedlozima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), Nacionalnog programa obrazovanja o kolesterolu u SAD-u (NCEP), Američkog udruženja kliničkih endokrinologa (AACE) i Međunarodnog udruženja za dijabetes (IDF)

ORGANIZACIJA / UDRUGA	Svjetska zdravstvena organizacija (WHO)	Nacionalni program obrazovanja o kolesterolu (NCEP)	Američko udruženje kliničkih endokrinologa (AACE)	Međunarodno udruženje za dijabetes (IDF)
<b>RIZIČNI ČIMBENIK</b>	diabetes mellitus, intolerancija glukoze, inzulinska rezistencija + bilo koja dva ili više rizičnih čimbenika	kombinacija bilo koja tri rizična čimbenika ili više njih	indicirani rizični čimbenici	povećan opseg struka (kriterij je etnički specifičan) + dva ili više rizičnih čimbenika
<b>PRETILOST</b>	indeks tjelesne mase (BMI) $\geq 30 \text{ kg m}^{-2}$ i/ili omjer struk-bokovi $\geq 0,9$ (M) $\geq 0,85$ (Ž)	opseg struka $\geq 102 \text{ cm}$ (M) $\geq 88 \text{ cm}$ (Ž)	indeks tjelesne mase (BMI) $\geq 25 \text{ kg m}^{-2}$ i opseg struka $\geq 102 \text{ cm}$ (M) $\geq 88 \text{ cm}$ (Ž)	opseg struka $\geq 94 \text{ cm}$ (M) $\geq 80 \text{ cm}$ (Ž)
<b>MNOŽINSKA KONCENTRACIJA (c) GLUKOZE NA TAŠTE (mmol L<sup>-1</sup>)</b>		$\geq 6,1$	$\geq 6,1$	$\geq 5,6$
<b>MNOŽINSKA KONCENTRACIJA (c) TRIACILGLICEROLA U PLAZMI (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	$\geq 1,7$	$\geq 1,7$	$\geq 1,7$	$\geq 1,7$
<b>MNOŽINSKA KONCENTRACIJA (c) HDL-KOLESTEROLA U PLAZMI (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	$< 0,9$ (M) $< 1,0$ (Ž)	$< 1,036$ (M) $< 1,295$ (Ž)	$< 1,036$ (M) $< 1,295$ (Ž)	$< 1,036$ (M) $< 1,295$ (Ž)
<b>ARTERIJSKI TLAK (mmHg)</b>	$\geq 140/90$	$\geq 130/85$	$\geq 130/85$	$\geq 130/85$
<b>MIKRO-ALBUMINURIJA</b>	$> 30 \text{ mg}$ albumina /g kreatina			

Kratice: M – muškarci; Ž – žene; indeks tjelesne mase (BMI, *engl. Body Mass Index*)



Prema definiciji Nacionalnog programa obrazovanja o kolesterolu (NCEP ATP III) iz Sjedinjenih Američkih Država, osoba ima metabolički sindrom ukoliko ispunjava tri ili više od sljedećih uvjeta koji uključuju visceralnu pretilost, hipertrigliceridemiju, sniženi HDL-kolesterol u krvi, povišen arterijski tlak i povišenu koncentraciju glukoze u krvi na tašte (Tablica 1.).

Ova definicija se razlikuje od definicije Svjetske zdravstvene organizacije prvenstveno u tome što prema NCEP ATP III inzulinska rezistencija nije obvezatan čimbenik za razvoj metaboličkog sindroma. Uz to, ona prepoznaje abdominalnu pretilost kao „glavnog krivca“ za razvoj metaboličkog sindroma, te time posljedično indeks tjelesne mase (BMI) koji je parametar za općenitu pretilost, nije uključen u definiciju.<sup>13</sup>

Američko udruženje kliničkih endokrinologa (AACE) preferira korištenje termina „sindrom inzulinske rezistencije“, a ne termin „metabolički sindrom“. Glavni kriterij koji razmatraju jest snižena/smanjena tolerancija glukoze (IGT, *engl. impaired glucose tolerance*), povišena koncentracija triacilglicerola, snižena koncentracija HDL-kolesterola, povišen krvni tlak i pretilost. Nisu specificirali određeni broj kriterija za dijagnozu metaboličkog sindroma, već to prepuštaju kliničkoj procjeni. Predložili su da se u razmatranje pri kliničkom prosuđivanju uključe čimbenici poput obiteljske povijesti bolesti kao što su aterosklerotične kardiovaskularne bolesti ili šećerna bolest tipa 2, sindrom policističnih jajnika, hiperuricemija te druge čimbenike koji spadaju u hemodinamičke promjene, protrombotične čimbenike, upalne biljege i endotelijalnu funkciju. Pacijenti sa šećernom bolesti tipa 2 bili su isključeni iz definicije sindroma inzulinske rezistencije.

Međunarodno udruženje za dijabetes (IDF) objavilo je globalnu, opće usuglašenu definiciju za metabolički sindrom, s razgraničenjima za rasu i spol.<sup>14</sup>

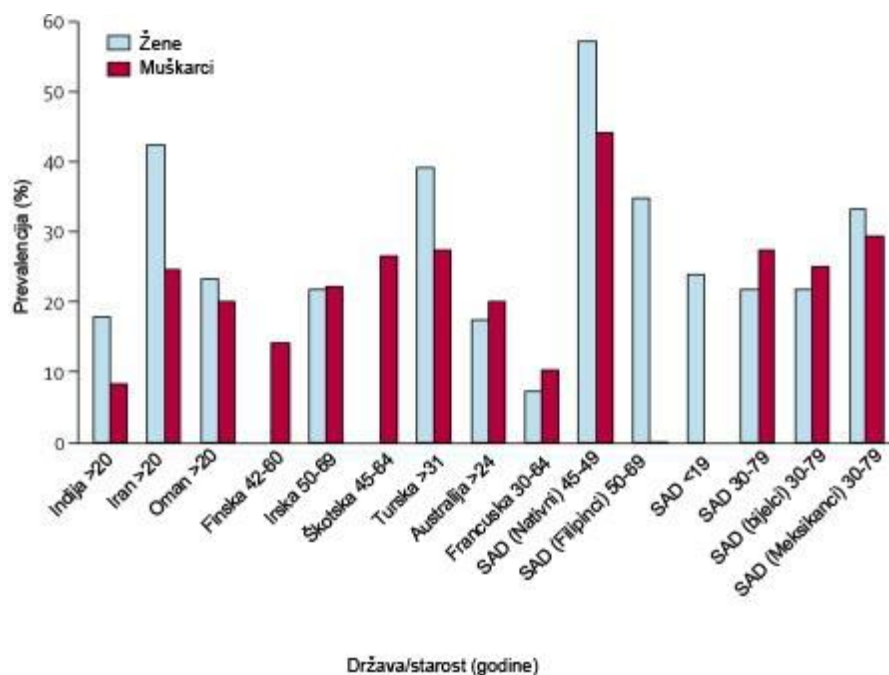
Obzirom na rasne i etničke razlike između populacijskih skupina, predložen je novi parametar – indeks centralne pretilosti (ICO, *engl. the indeks of central obesity*) definiran kao omjer opsega struka i visine.<sup>15</sup>

Prema smjernicama nekoliko usuglašenih međunarodnih i američkih udruga – Međunarodnog udruženja za dijabetes (International Diabetes Federation), Nacionalnog instituta za srce, pluća i krv (National Heart, Lung, and Blood Institute), Američke udruge za srce (American Heart Association), Svjetske federacije za srce (World Heart Federation), Međunarodnog društva za aterosklerozu (International Atherosclerosis Society) i Međunarodne udruge za proučavanje debljine (International Association for the Study of Obesity) za

dijagnozu metaboličkog sindroma u konačnici se najčešće primjenjuju kriteriji od kojih moraju biti zadovoljena barem tri (abdominalna pretilost, hipertrigliceridemija, smanjena koncentracija HDL-kolesterola u krvi, hipertenzija i hiperglikemija) prema graničnim vrijednostima navedenim u Tablici 1.

### 2.1.2. EPIDEMIOLOGIJA METABOLIČKOG SINDROMA

Prevalencija metaboličkog sindroma u svijetu kreće se od manje od 10% do 84%, ovisno o području, urbanom ili ruralnom okolišu, spolu, dobi, rasi i etničkoj pripadnosti populacije te korištenoj definiciji sindroma.<sup>16, 17</sup> Međunarodno udruženje za dijabetes (IDF) procjenjuje da jedna četvrtina odrasle svjetske populacije ima metabolički sindrom.<sup>12</sup> Viši socioekonomski status, sjedilački način života i visoka vrijednost indeksa tjelesne mase (BMI) značajno su povezani s metaboličkim sindromom. Genetičko nasljedstvo, prehrana, fizička aktivnost, pušenje, dijabetes u obiteljskoj povijesti i obrazovanje utječu na prevalenciju metaboličkog sindroma i njegovih komponenti.<sup>18</sup> Opažena prevalencija metaboličkog sindroma u objavljenj Anketi o nacionalnom zdravlju i pregledu prehrane (NHANES, *engl. National Health and Nutrition Examination Survey*) među populacijom Sjedinjenih Američkih Država u periodu između 1988. i 1994. godine iznosila je 5% kod ispitanika normalne težine, 22% među ispitanicima prekomjerne težine i 60% u pretilih osoba.<sup>19</sup> Prevalencija nadalje raste s dobi (10% kod pojedinaca između 20 i 29 godina, 20% kod pojedinaca u životnoj dobi između 40 i 49 godina i 45% kod pojedinaca u dobi između 60 i 69 godina).<sup>20</sup> Prema Nacionalnom programu obrazovanja o kolesterolu (NCEP ATP III), rasprostranjenost varira od 8% do 43% u muškaraca te od 7% do 56% kod osoba ženskog spola širom svijeta.<sup>18</sup> (Slika 1) Porast prevalencije javlja se između dvadesetih i šezdesetih/sedamdesetih godina života kod muškaraca i kod žena.<sup>19</sup>



Slika 1. Prevalencija metaboličkog sindroma prema NCEP ATP III definiciji u nekim zemljama širom svijeta (prilagođeno prema <sup>18</sup>)

Visoka je rasprostranjenost metaboličkog sindroma kod žena u postmenopauzi, i kreće se između 32,6% i 41,5%.<sup>21</sup> Izvještaj Framinghamske studije (*engl. Framingham Heart Study*) indicira da je porast tjelesne mase  $\geq 2,25$  kg u periodu od 16 godina povezan s preko 45%-tnim porastom rizika od razvoja metaboličkog sindroma.<sup>22</sup> Svako povećanje od 11 cm u opsegu struka povezano je s 80%-tnim povećanjem rizika za razvoj metaboličkog sindroma unutar 5 godina.<sup>23</sup> Metaboličke promjene zbivaju se istovremeno, te češće nego što bi se očekivalo - poklapanjem nekoliko čimbenika povisuje se kardiovaskularni rizik preko i iznad rizika povezanog sa samim pojedinačnim čimbenicima.<sup>24</sup> Rizik se povećava s brojem prisutnih komponenata metaboličkog sindroma.<sup>25</sup>

Prema Poljičanin i sur. prevalencija metaboličkog sindroma u Republici Hrvatskoj je 39 do 42% u žena i 28 do 35% u muškaraca, a razlike ovise o regiji i korištenom kriteriju.<sup>26</sup>

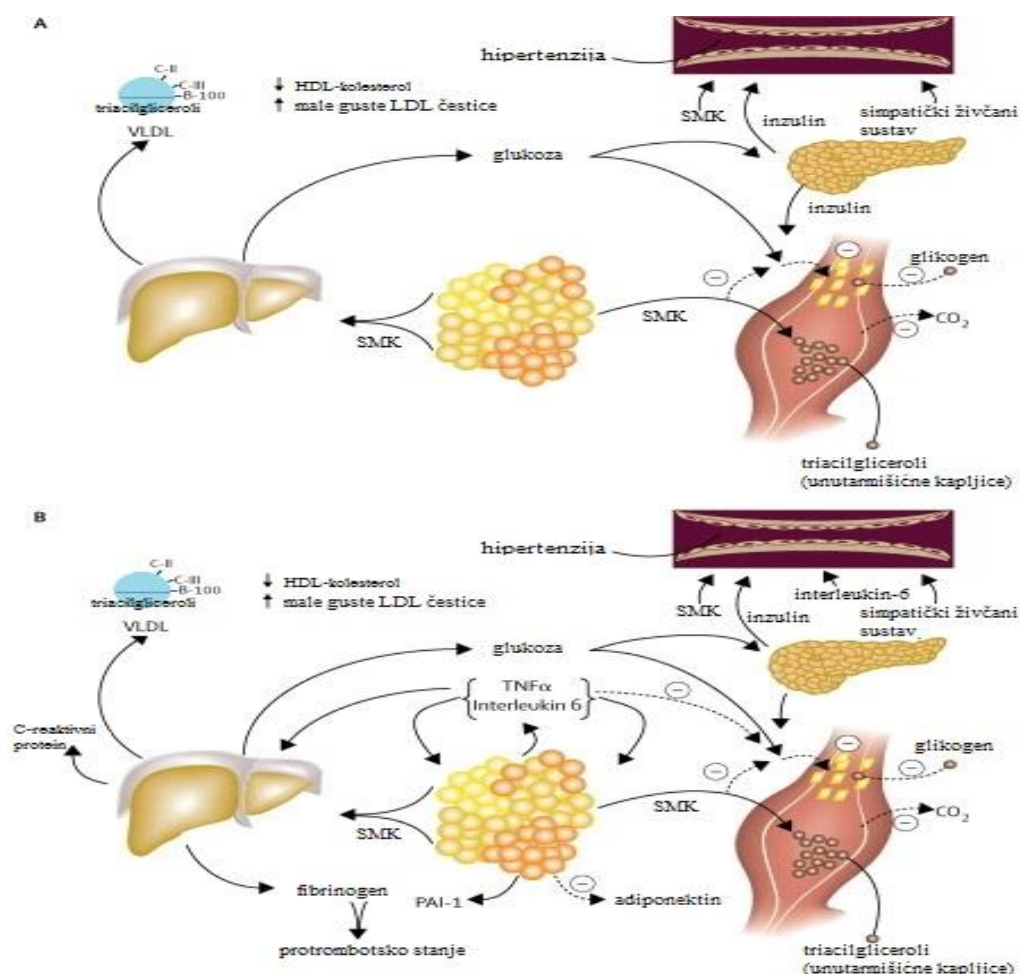
Prema studiji koja je provedena u Baranji, na heterogenoj etničkoj skupini (populacija Hrvata, Mađara i Srba) sa sličnim stilom življenja, prema NCEP kriterijima prevalencija je 40% (35% u muškaraca i 42% u žena), s indeksom tjelesne mase kao prediktorom pretilosti, odnosno 42% (52% u muškaraca i 39% u žena) s omjerom struk/bokovi kao prediktorom pretilosti.<sup>27</sup> Uz genetičke čimbenike rizika, okolišni čimbenici koji uključuju prehrambene navike i relativno

urbani način života u modernom društvu utjecali su na metabolička svojstva i doveli do povišenja prevalencije metaboličkog sindroma.

U studiji provedenoj u južnom dijelu Hrvatske (otok Hvar), također prema NCEP kriterijima prevalencija metaboličkog sindroma je 26% (32% u muškaraca i 24% u žena) uz korištenje indeksa tjelesne mase kao prediktora pretilosti, dok prevalencija s omjerom struk/bokovi kao prediktorom pretilosti iznosi 42% (57% u muškaraca i 36% u žena). Prevalencija je u ovom području Republike Hrvatske nešto niža no na sjeveru države (iako je u suštini visoka), što se djelomično tumači mediteranskim tipom ishrane.<sup>28</sup> U studiji koja je obuhvaćala ispitanike iz istraživačkog programa “1001 Dalmatinac” provedenog u 2002. i 2003. godini na devet otoka u Jadranskom moru, s konačnim uzorkom od 996 ispitanika, 34% je ispunjavalo dijagnostičke kriterije za metabolički sindrom prema definiciji NCEP-ATP III, s nižom prevalencijom za muškarce (28%) nego za žene (39%).<sup>29</sup> U multicentričnom istraživanju provedenom u četiri urbana središta, dva u kontinentalnom dijelu Republike Hrvatske (Virovitica i Zagreb) i dva na Jadranskoj obali (Split i Omiš), u populaciji osoba starije životne dobi (dob ispitanika bila je između 70 i 90 godina starosti, a broj ispitanika bio je 320) značajno niža prevalencija metaboličkog sindroma pronađena je među ispitanicima iz manjih urbanih centara (Virovitica i Omiš) u odnosu na veće urbane centre (Zagreb i Split) prema dijagnostičkom kriteriju Međunarodnog udruženja za dijabetes (IDF).<sup>30</sup>

### *2.1.3. PATOFIZIOLOGIJA METABOLIČKOG SINDROMA*

S patofiziološkog stanovišta, metabolički sindrom je kronična upala niskog stupnja koja je posljedica složene interakcije između genetičkih i okolišnih čimbenika. Navedene interakcije samo su djelomično razjašnjene (Slika 2).



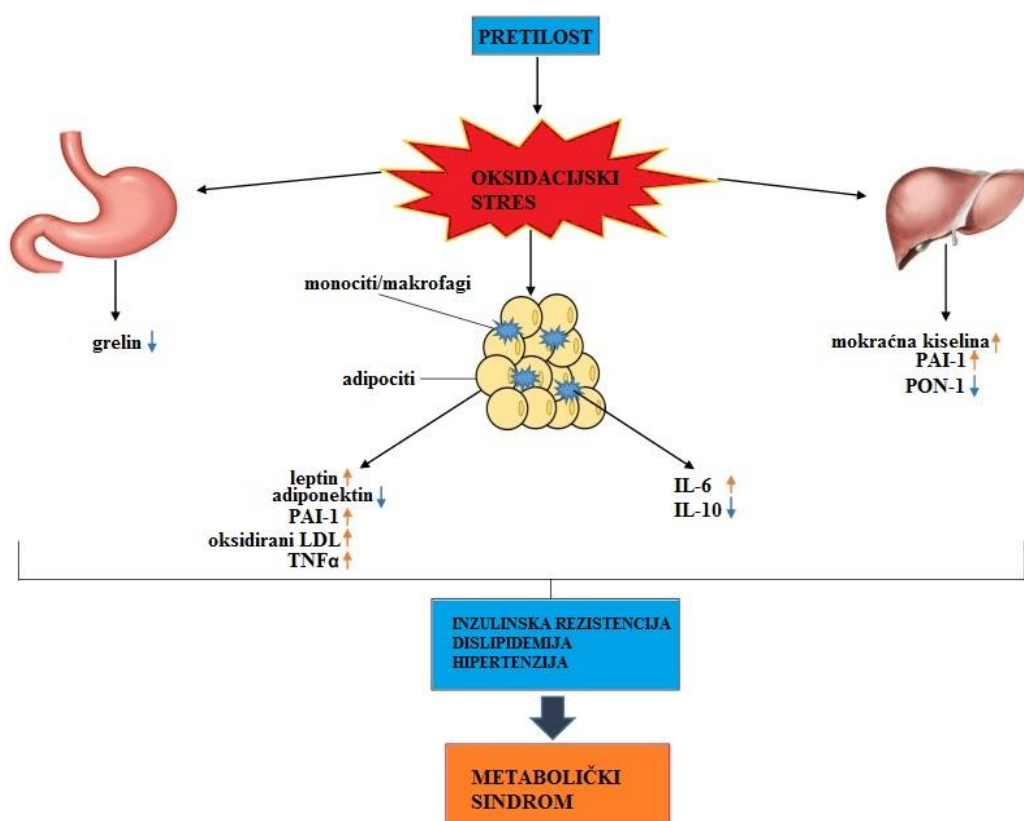
Slika 2. Patofiziološke interakcije u metaboličkom sindromu (inzulinska rezistencija)

**A:** Slobodne masne kiseline (SMK) oslobađaju se u obilju iz adipoznog tkiva povećane mase. U jetri, slobodne masne kiseline uzrokuju povišeno stvaranje glukoze i triacilglicerola te sekreciju čestica lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL). S time povezani poremećaji lipida/lipoproteina uključuju redukciju HDL-kolesterola i povećanje gustoće lipoproteina niske gustoće (LDL). Nadalje, slobodne masne kiseline smanjuju osjetljivost inzulina u mišićima inhibiranjem preuzimanja glukoze posredovanog inzulinom. Povezana oštećenja uključuju smanjivanje usmjeravanja glukoze u glikogen i povišenu akumulaciju lipida u triacilglicerole. Povišenje koncentracije glukoze u plazmi (i u određenoj mjeri slobodne masne kiseline) povisuje izlučivanje inzulina iz gušterače što rezultira hiperinzulinemijom. Ishod hiperinzulinemije može biti povećana reapsorpcija natrija i povišena aktivnost simpatičkog živčanog sustava što može pridonijeti hipertenziji kao što bi mogla pridonijeti povišena koncentracija slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji.

**B:** Parakrini i endokrini učinak proinflamatornog stanja preklapaju se i potpomažu inzulinsku rezistenciju nastalu radi prekomjernih slobodnih masnih kiselina. Proizvedeni u različitim

stanicama adipoznog tkiva (uključujući adipocite i makrofage nastale iz monocita) interleukin-6 (IL-6) i čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) povećano se izlučuju. Inzulinska rezistencija se povećava, kao i lipoliza triacilglicerola pohranjenih u adipoznom tkivu u slobodne masne kiseline. Povišena je koncentracija IL-6 i ostalih citokina u cirkulaciji, te može povećati nastanak glukoze i lipoproteina vrlo niske gustoće u jetri i inzulinsku rezistenciju u mišićima. Citokini i slobodne masne kiseline povećavaju proizvodnju fibrinogena i inhibitora-1 aktivatora plazminogena (PAI-1) u jetri što nadopunjuje prekomjernu proizvodnju PAI-1 u adipoznom tkivu, a rezultira protrombotskim stanjem. Smanjeno nastajanje protuupalnog i inzulinosjetljivog citokina adiponektina također je povezano s metaboličkim sindromom i može pridonijeti patofiziologiji sindroma. (prilagođeno prema <sup>6</sup>)

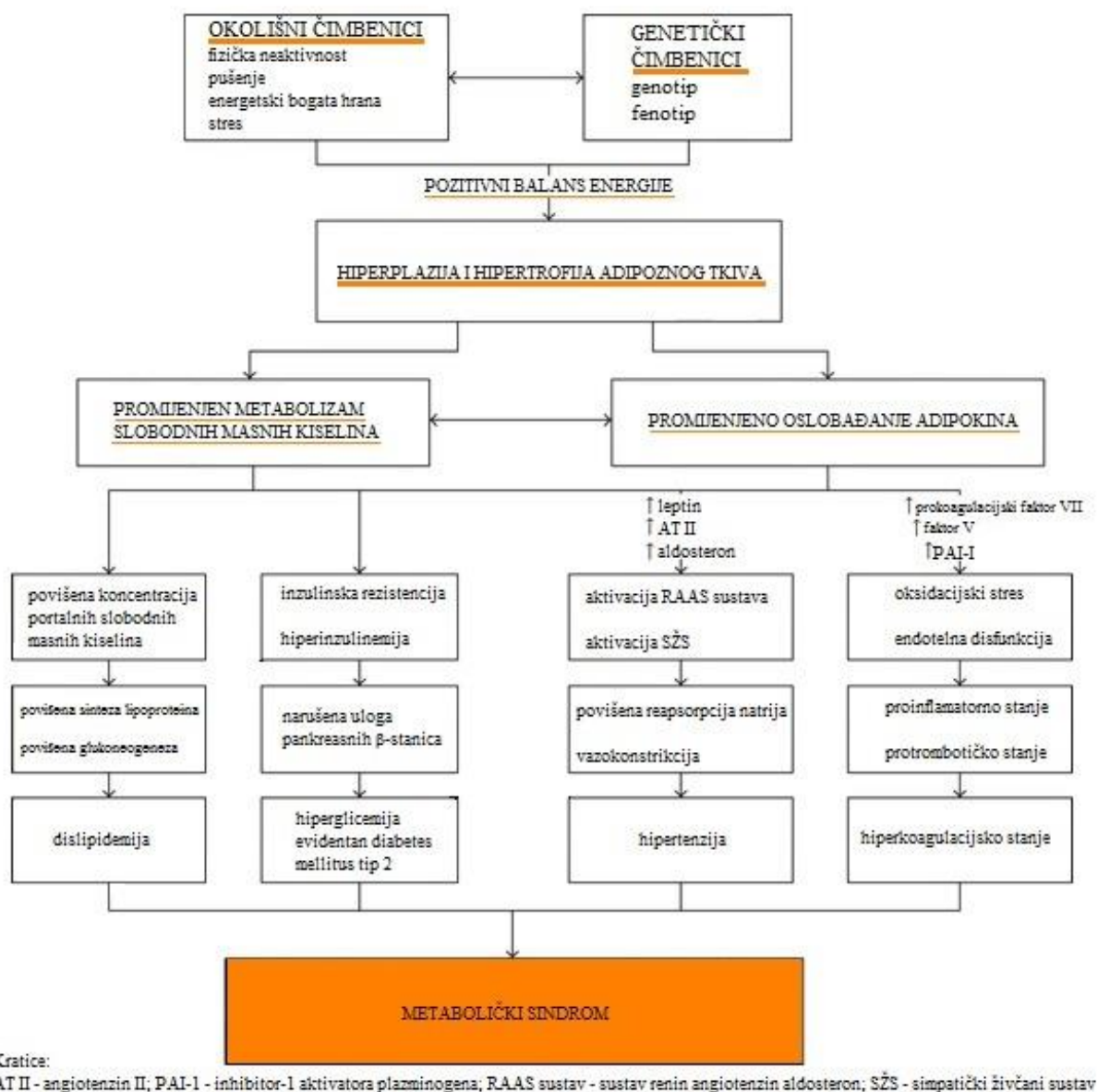
Neki od biomarkera metaboličkog sindroma prikazani su na slici 3. Bit će potrebna daljnja istraživanja kako bi se utvrdila učinkovitost primjene ovih biomarkera u dijagnostici i liječenju u kliničkom okruženju.



Slika 3. Biomarkeri metaboličkog sindroma

PAI-1 - inhibitor-1 aktivatora plazminogena; TNF $\alpha$  - čimbenik nekroze tumora  $\alpha$ ; PON-1 – paraoksonaza-1; IL-6 - interleukin-6; IL-10 – interleukin-10) (prilagođeno prema <sup>31</sup>)

Inzulinska rezistencija, visceralna debljina, aterogena dislipidemija, endotelna disfunkcija, genetička osjetljivost, povišen krvni tlak, hiperkoagulacijsko stanje i kronični stres neki su od čimbenika koji čine sindrom.<sup>7</sup> (Slika 4)

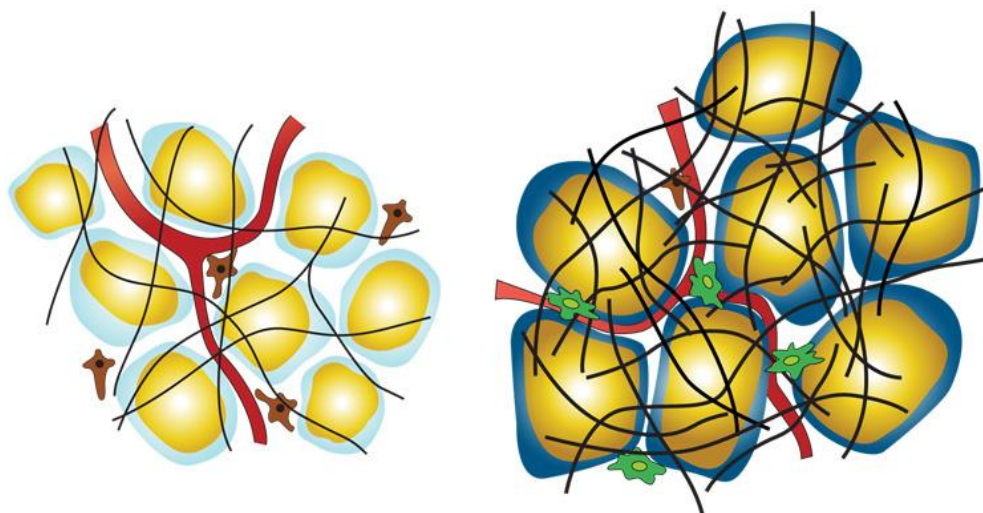


Slika 4. Shematski prikaz metaboličkog sindroma (prilagođeno prema <sup>7</sup>)

### 2.1.3.1. ABDOMINALNA PRETILOST

Epidemija pretilosti pokrenuta je povišenom konzumacijom jeftine, kalorične hrane i smanjenom fizičkom aktivnosti. Adipozno tkivo je heterogeno i sastoji se od adipocita,

stromalnih preadipocita, imunoloških stanica i endotela. Odaziva se dinamično i hitro na promjene u višku nutrijenata putem hipertrofije i hiperplazije adipocita.<sup>32</sup> S pretilosti i progresivnim povećanjem adipocita, prokrvljenost adipocita se smanjuje, a slijedi je hipoksija.<sup>33</sup> (Slika 5)



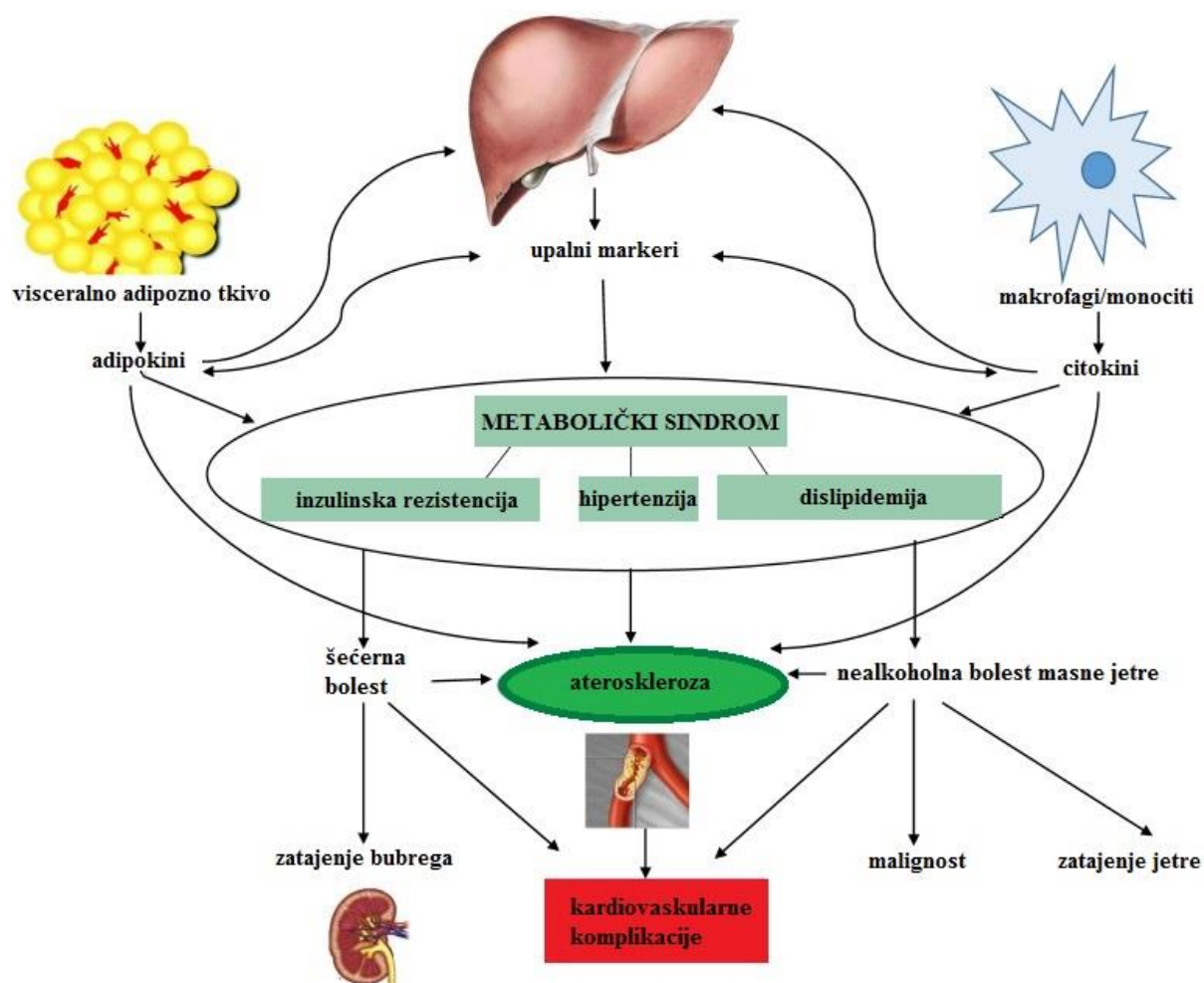
Slika 5. Prikaz adipoznog tkiva vitkih (lijevo) i pretilih osoba (desno)

Prikazani su adipociti s žutim lipidnim kapljicama i plavom citoplazmom. Kod vitkih osoba citoplazma prikazana svjetlo plavom bojom predstavlja stanje normoksije, dok tamno plava kod pretilog stanja predstavlja stanje hipoksije. Preadipociti su prikazani smeđom bojom, makrofagi zelenom, krvne žile/stanice endotela crvenom, a vanstanični matriks crnom bojom. (prilagođeno prema <sup>32</sup>)

Predmijeva se da hipoksija potiče nekrozu i infiltraciju makrofaga u adipozno tkivo što dovodi do prekomjernog nastanka biološki aktivnih metabolita – adipocitokina – koji uključuju glicerol, slobodne masne kiseline, proinflamatorne medijatore: čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , *engl. tumor necrosis factor alpha*) i interleukin-6 (IL-6), te inhibitor-1 aktivatora plazminogena (PAI-I) i C-reaktivni protein (CRP). Kao posljedica javlja se lokalizirana upala u adipoznom tkivu koja promiče cjelokupnu sistemska upalu. Komorbiditet povezan s pretilošću tako je povezan s upalnim procesom.<sup>34</sup> Adipocitokini integriraju endokrine, autokrine i parakrine signale kako bi posredovali u višestrukim procesima koji uključuju osjetljivost na inzulin,<sup>35</sup> oksidacijski stress,<sup>36</sup> koagulaciju krvi, metabolizam i upalni odgovor,<sup>37</sup> za koje se smatra da ubrzavaju aterosklerozu, rupturu plakova i aterotrombozu. To pokazuje da



adipozno tkivo nije specijalizirano samo za pohranu i mobilizaciju lipida, već i osobit endokrini organ koji oslobađa brojne citokine. Slika 6 prikazuje interakcije adipokina, citokina i upalnih markera koji pridonose razvoju metaboličkog sindroma i njegovih komplikacija.



Slika 6. Interakcije adipokina, citokina i upalnih markera koji pridonose razvoju metaboličkog sindroma i njegovih komplikacija (prilagođeno prema <sup>31</sup>)

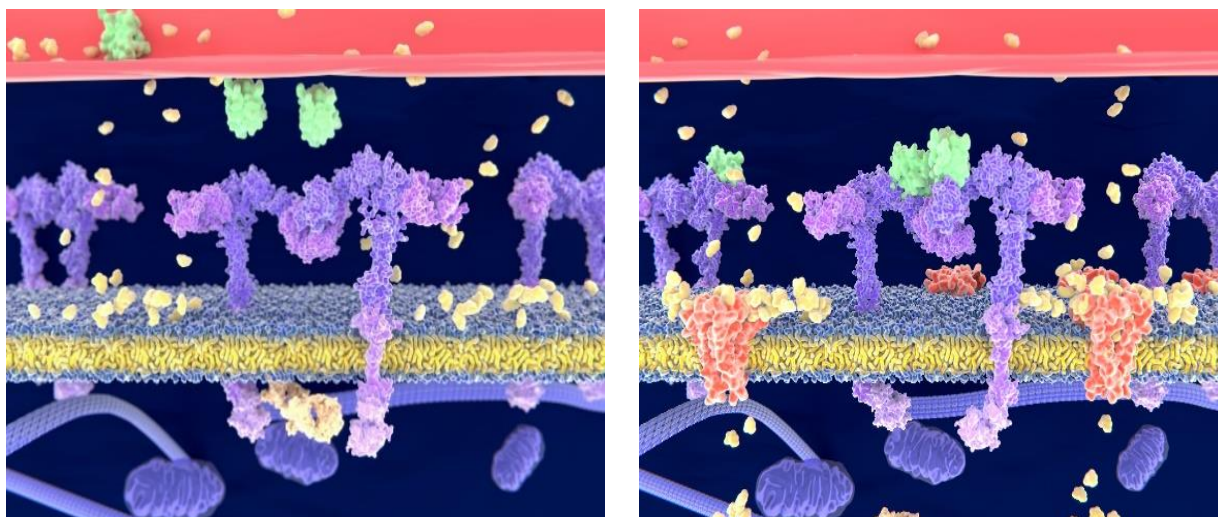
### 2.1.3.2. SLOBODNE MASNE KISELINE

Potkožni adipociti gornjeg dijela tijela proizvode većinu cirkulirajućih slobodnih masnih kiselina dok je sadržaj intraabdominalnog masnog tkiva u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama slobodnih masnih kiselina u crijevima, što bi moglo pridonijeti nakupljanju masti u jetri.<sup>38</sup> Akutna izloženost skeletnih mišića povišenim koncentracijama masnih kiselina inducira inzulinsku rezistenciju inhibicijom ulaska glukoze u stanice koja je posredovana

inzulinom, dok kronična izloženost gušterače povišenoj koncentraciji masnih kiselina narušava ulogu njenih  $\beta$ -stanica.<sup>39</sup> Slobodne masne kiseline povišuju proizvodnju fibrinogena i inhibitora-1 aktivatora plazminogena (PAI-1).<sup>40</sup>

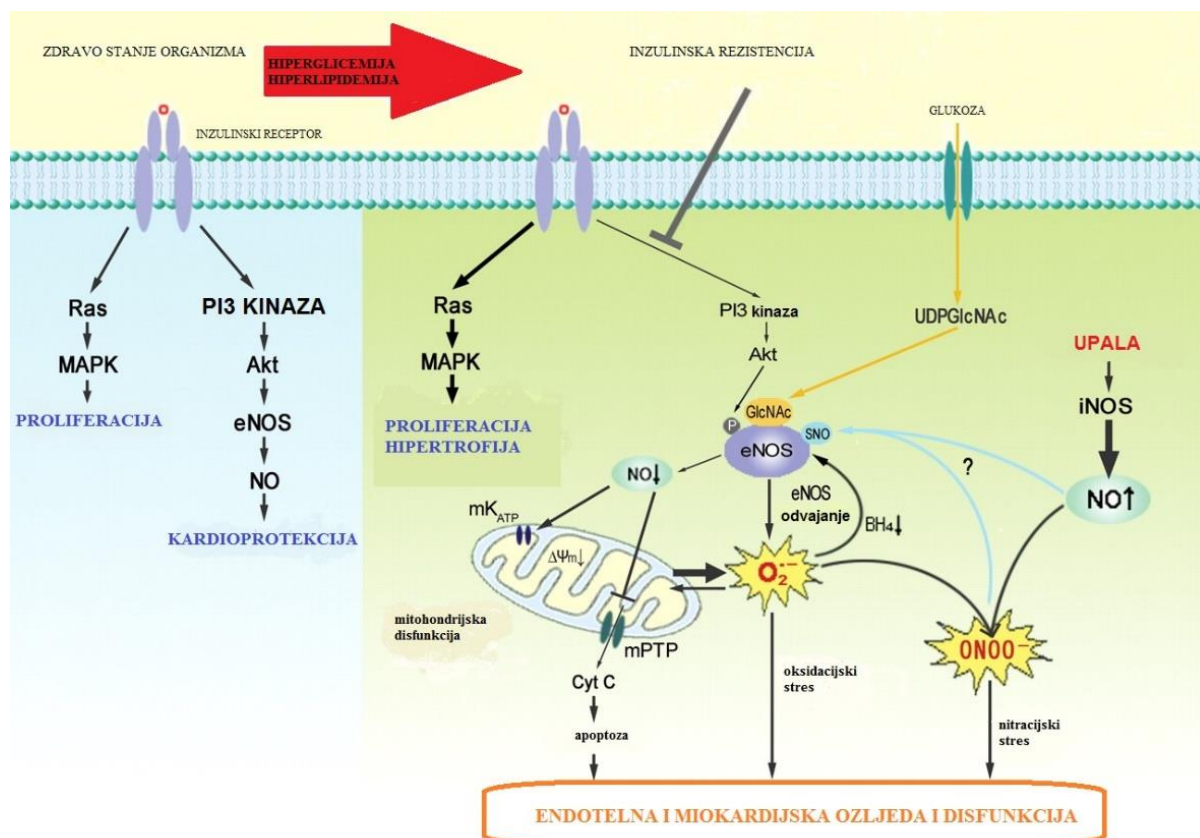
### 2.1.3.3. INZULINSKA REZISTENCIJA

Inzulinska rezistencija definira se kao odgovor na inzulin manji od normalnog. Karakteristike inzulin-ovisnog fenotipa uključuju normalnu tjelesnu masu<sup>41</sup> bez abdominalne (visceralne) pretilosti,<sup>42</sup> umjerenu tjelesnu aktivnost<sup>43</sup> i konzumaciju hrane s malo zasićenih masnoća.<sup>44</sup> Alternativno, pojedinci s inzulinskom rezistencijom pokazuju smanjen metabolizam glukoze ili toleranciju glukoze - promijenjenim odazivom na promjene koncentracije glukoze; povišenu koncentraciju glukoze natašte i/ili očiglednu hiperglicemiju; smanjeno djelovanje inzulina nakon intravenske primjene inzulina sa smanjenim uklanjanjem glukoze posredovanim inzulinom i/ili smanjenje supresije endogene proizvodnje glukoze. Definirana je kao patofiziološko stanje u kojem normalne koncentracije inzulina ne izazivaju adekvatni odaziv na inzulin u perifernim ciljnim tkivima kao što su adipozno tkivo, mišićno tkivo i jetra. Pod tim uvjetima  $\beta$ -stanice gušterače osoba rezistentnih na inzulin izlučuju više inzulina kako bi se nadvladala hiperglicemija. Iako se u rezistenciji na inzulin određena biološka djelovanja inzulina mogu nadoknaditi hiperinzulinemijom (npr. održavanje normoglicemije), u tkivima s normalnom osjetljivošću na inzulin to može dovesti do prekomjernoga djelovanja inzulina.<sup>45</sup> S vremenom, nesposobnost  $\beta$ -stanica gušterače da proizvedu dostatne količine inzulina kako bi se ispravila inzulinska rezistencija u tkivima koja su u pogoršanom stanju, vodi do hiperglicemije i očite šećerne bolesti tipa 2.<sup>46</sup> Fiziološka signalizacija inzulinom zbiva se nakon vezanja inzulina za inzulinski receptor (Slika 7), tirozin-kinazu aktiviranu ligandom.



Slika 7. Vezanje inzulina (zeleno) za inzulinski receptor (ljubičasto) aktivira transport glukoze (žuto) u stanicu. (preuzeto iz <sup>47</sup>)

Vezanje inzulina rezultira fosforilacijom nizvodnih supstrata i aktivacijom dva usporedna puta: puta fosfoinozimid-3-kinaze (PI3K) i puta protein-kinaze aktivirane mitogenom (MAPK) (Slika 8). U inzulinskoj rezistenciji je PI3K put pogođen a MAPK put se odvija normalno. To vodi do promjene u ravnoteži između ova dva usporedna puta. Inhibicija PI3K-Akt puta dovodi do smanjenja proizvodnje dušikova(II) oksida (NO) u endotelu, što rezultira endotelnom disfunkcijom i smanjenjem translokacije transportera glukoze GLUT4.<sup>48</sup> U MAPK putu kontinuiran je nastanak endotelina-1, vazokonstriktora i mitogenog stimulatora krvožilnih glatkih mišićnih stanica. Inzulinska rezistencija time vodi do krvožilnih promjena koje predisponiraju aterosklozu. Iako osobe rezistentne na inzulin ne moraju nužno biti pretile, obično imaju poremećenu distribuciju masti koju karakterizira predominantno nakupljanje u gornjem dijelu tijela. Abdominalna pretilost u snažnijoj je uzajamnoj vezi s inzulinskom rezistencijom i metaboličkim sindromom od pretilosti donjeg dijela tijela.<sup>49</sup>



Slika 8. Put fosfatidilinozitol-3'-kinaze (PI3K) i put mitogenom aktivirane protein-kinaze (MAPK) u zdravom stanju organizma i inzulinskoj rezistenciji.

Pogoršanje u signalizaciji inzulina–PI3K–Akt–eNOS–NO definira ključne karakteristike inzulinske rezistencije i kardiovaskularne disfunkcije. Usporedna i uravnotežena inzulinska signalizacija između PI3K–Akt–eNOS i Ras–MAPK održava normalni kardiovaskularni rast, metabolizam i djelovanje u zdravlju (lijevo). Inzulinska rezistencija diferencijalno pogađa PI3K i MAPK signalne putove, tj. PI3K–Akt–eNOS signalizacija je smanjena dok je Ras–MAPK put manje pogođen ili čak povećan tijekom hiperinzulinemije (desno). Zbog snižene aktivacije protein-kinaze Akt smanjuje se fosforilacija eNOS. Osim toga hiperglikemija inducira glikozilaciju eNOS koji se modificira s *O*-GlcNAc. Glikozilacija i smanjena fosforilacija eNOS dovode do smanjenja nakupljanja NO i mitohondrijske disfunkcije zbog čega se povećava stvaranje  $\cdot\text{O}_2^-$ , rasprezanje eNOS i oksidacijski stres. S druge strane, upala aktivira iNOS što dovodi do prekomjernog nastanka NO i nitracijskog stresa, u kojem nastaje  $\text{ONOO}^-$  zbog povišenih koncentracija  $\cdot\text{O}_2^-$  i NO. Molekula  $\text{ONOO}^-$  izravno pridonosi endotelnoj i miokardijskoj ozljedi te disfunkciji u inzulinskoj rezistenciji i srodnim kardiovaskularnim bolestima.

Kratice: Akt, protein-kinaza B; BH<sub>4</sub>, tetrahidrobiopterin; Cyt C, citokrom *c*; eNOS, endotelna sintaza dušikova(II) oksida; GlcNAc, *N*-acetilglukozamin; iNOS, inducibilna izoforma sintaze dušikova(II) oksida; MAPK, mitogenom aktivirana protein-kinaza; mK<sub>ATP</sub>, mitohondrijska K<sup>+</sup>-ATPaza; mPTP, mitohondrijska permeabilna tranzicijska pora; PI3K, fosfatidilinozitol-3'-kinaza; P, fosforilacija; i SNO, S-nitrozotiol. (prilagođeno prema <sup>50</sup>)

#### 2.1.3.4. DISLIPIDEMIJA

Kvalitativne abnormalnosti lipida reflektiraju perturbacije u strukturi, metabolizmu i biološkoj aktivnosti aterogenih lipoproteina i antiaterogenog HDL-kolesterola, što uključuje povišenje koncentracije apolipoproteina B, povišenje koncentracije triacilglicerola, sniženje koncentracije malih čestica LDL, i niske koncentracije HDL-kolesterola. Inzulinska rezistencija dovodi do aterogene dislipidemije na nekoliko načina. Kao prvo, inzulin normalno suprimira lipolizu u adipocitima, tako da poremećaj u inzulinskoj signalizaciji povisuje lipolizu, što dovodi do povišenja koncentracije slobodnih masnih kiselina. U jetrima, slobodne masne kiseline služe kao supstrat za sintezu triacilglicerola. Slobodne masne kiseline uz to stabiliziraju nastanak apolipoproteina B, najveće proteinske komponente lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL), što rezultira dodatnom proizvodnjom VLDL. Kao drugo, inzulin u normalnim uvjetima degradira apolipoprotein B kroz put fosfoinozimid-3-kinaze (PI3K), tako da inzulinska rezistencija izravno povisuje sintezu VLDL. Treće, inzulin regulira aktivnost lipoprotein-lipaze, koja ograničava brzinu uklanjanja VLDL i najznačajniji je posrednik u uklanjanju VLDL. Dakle, hipertrigliceridemija u inzulinskoj rezistenciji je rezultat povišenog nastanka VLDL kao i smanjenog uklanjanja VLDL. VLDL se metabolizira u ostatne lipoproteine i male guste čestice LDL. I jedne i druge čestice mogu potaknuti stvaranje ateroma. Triacilgliceroli u VLDL prenose se u HDL kolesteril-ester transportnim proteinom (CETP, *engl. cholesteryl ester transfer protein*) u zamjenu za estere kolesterola, što rezultira česticama HDL obogaćenima triacilglicerolima i VLDL česticama obogaćenima kolesteril-esterima. Čestice HDL obogaćene triacilglicerolima bolji su supstrat za jetrenu lipazu, tako da se hitro uklanjaju iz cirkulacije, a preostale čestice HDL sudjeluju u transportu kolesterola iz krvnih žila. Prema tome, u jetrima inzulin rezistentnih pacijenata, tok slobodnih masnih kiselina je visok, sinteza triacilglicerola i pohrana su povišene, a višak triacilglicerola se luči kao VLDL.<sup>51</sup> Najvećim dijelom, vjeruje se da je dislipidemija povezana s inzulinskom rezistencijom izravna posljedica povišene sekrecije

VLDL iz jetara.<sup>52</sup> Ti poremećaji blisko su povezani s oksidativnim stresom i endotelnom disfunkcijom, te time jačaju proinflamacijsku prirodu makrovaskularnih aterosklerotičkih bolesti.

#### 2.1.3.5. HIPERTENZIJA

Bazična hipertenzija često je povezana s više metaboličkih poremećaja od kojih su najčešće pretilost, intolerancija glukoze i dislipidemija.<sup>53</sup> Rezultati provedenih istraživanja navode da i hiperglicemija i hiperinzulinemija aktiviraju sustav renin-angiotenzin (RAS, *engl. renin angiotensin system*) povišenjem ekspresije angiotenzinogena, angiotenzina II (AT II) i AT1 receptora koji zajedno mogu pridonijeti razvoju hipertenzije u pacijenata s inzulinskom rezistencijom.<sup>54</sup> Inzulinska rezistencija i hiperinzulinemija vode do aktivacije simpatičkog živčanog sustava što rezultira reapsorpcijom natrija u bubrežima, povišenjem srčanog minutnog volumena, vazokonstrukcijom arterija i posljedično hipertenzije.<sup>55</sup> U odgovoru na angiotenzin II adipociti također proizvode aldosteron, signalnim putem ovisnim o kalcineurinu.<sup>56</sup> Aldosteron proizveden u adipocitima regulira diferencijaciju samih adipocita i krvožilni sustav u autokrinom i parakrinom smislu, te se u tom smislu na adipocite može gledati kao na minijaturne sustave renin-angiotenzin-aldosteron.

#### 2.1.3.6. ISHRANA

Unos hrane u organizam s velikim udjelom masti povezan je s oksidacijskim stresom i aktivacijom proupalnog transkripcijskog jezgrinog čimbenika kappa B (NF- $\kappa$ B, *engl. nuclear factor  $\kappa$ B*).<sup>57</sup> Ishrana bogata voćem i vlaknima nema kapaciteta za poticanje upalnih procesa u usporedbi s ishranom bogatom mastima, čak i kod jednakog sadržaja kalorija.<sup>58</sup>

#### 2.1.3.7. GENETIČKE PREDISPOZICIJE

Postoje različita mišljenja o definicijama metaboličkog sindroma, a provedene studije imaju relativno malu snagu i teško je detektirati suptilan učinak genetičkih varijacija, te je stoga

teško secirati genetiku metaboličkog sindroma.<sup>59</sup> Značajno međudjelovanje genetičkih čimbenika i čimbenika okoliša očituje se u velikim razlikama u osjetljivosti i dobi pojedinaca na vrlo slične profile rizika.<sup>60</sup> Neke osobe koje nisu pretile prema tradicionalnim mjerama, usprkos tomu su rezistentne na inzulin i imaju aberantne razine metaboličkih rizičnih čimbenika. Moguće je da ekspresija svakog metaboličkog čimbenika rizika spada samo djelomično pod svoju vlastitu genetičku kontrolu, što utječe na odgovor na različite izloženosti okoliša. Primjerice, razni polimorfizmi u genima koji utječu na metabolizam lipoproteina povezani su s pogoršavanjem dislipidemije među pretilim osobama.<sup>61</sup> Isto tako, genetička predispozicija za neispravno izlučivanje inzulina u kombinaciji s inzulinskom rezistencijom podiže koncentraciju glukoze u plazmi do abnormalnih vrijednosti.<sup>62</sup>

Prema „hipotezi štedljivog genotipa“<sup>63</sup> pojedinci koji žive u surovom okolišu s nestabilnom opskrbom hranom, povećali bi svoju vjerojatnost preživljavanja ukoliko bi mogli dovesti do maksimuma pohranu viška energije. Genetička selekcija tako bi pogodovala „energetsko-očuvajućim“ genotipovima u takvom okolišu. Drugim riječima, predloženi geni kandidati za metabolički sindrom umiješani su u pohranu energije i često podržavaju štedljivi fenotip.<sup>64</sup> Među genima kandidatima spominju se geni za  $\beta_3$ -adrenergički receptor, lipazu osjetljivu na hormone, lipoprotein-lipazu, supstrat za inzulinski receptor 1 (IRS-1; *engl. Insulin receptor substrate 1*), glikoprotein-1 plazma stanica (PC-1; *engl. plasma cell glycoprotein 1*) i glikogen-sintazu skeletnih mišića, premda su među genima koji pridonose metaboličkom sindromu i nadalje primarni kandidati geni koji reguliraju lipolizu i termogenezu.<sup>65</sup> Odabrane genetičke varijacije preferirane tijekom malnutricije mogle bi postati nepovoljne kada se poboljša prehrana. Ta hipoteza pretpostavlja da česte genetičke varijante štedljivih gena predisponiraju metaboličkom sindromu. Slična hipoteza postavljena je i 1992. godine.<sup>66</sup> Prema ovoj hipotezi, dojenčad koja je iskusila intrauterinu pothranjenost, možda se adaptirala na slabu ishranu smanjenjem trošenja energije i postajući „štedljiva“. Takve metaboličke adaptacije su blagotvorne kada su pojedinci slabo hranjeni tijekom djetinjstva i zrele dobi, ali s povećanim unosom hrane prilagodbe više nisu blagotvorne i mogu dovesti do povećanog rizika od metaboličkog sindroma u kasnijem životu. Podrška toj hipotezi proizlazi iz opažene povezanosti niske porođajne mase s kasnijim razvojem inzulinske rezistencije i šećerne bolesti tipa 2 u različitim populacijama.<sup>67</sup>

Mnogi genetički polimorfizmi mogli bi biti umiješani u patogenezu metaboličkog sindroma. Geni odgovorni za metabolizam i transport lipida, regulaciju arterijskog krvnog

tlaka, transport, regulaciju i metabolizam glukoze, hormonalne čimbenike i ostale čimbenike mogu doprinijeti razvoju metaboličkog sindroma.<sup>68</sup> Genima kandidatima koji najviše „obećavaju“ smatraju se oni koji su povezani s najmanje dva čimbenika metaboličkog sindroma, kao što su oni za adrenergičke  $\beta$ -receptore (ADRB1, ADRB2 i ADRB3) koji su povezani s pretilošću, hipertenzijom i intolerancijom glukoze.<sup>69</sup> Nekoliko potencijalnih kandidata predloženo je radi njihovog biološkog značaja, kao što su geni za balans energije u sustavu, za particioniranje nutrijenata, metabolizam lipida i inzulina, lipolizu, termogenezu, oksidaciju metaboličkog goriva i ulazak glukoze u skeletne mišiće. Mnogi od tih gena povezani su s metaboličkim sindromom kod različitih etničkih populacija, a uključuju gene za adiponektin, receptor za aktivator proliferacije peroksisoma (PPAR), adrenergičke  $\beta$ -receptore, supstrat za inzulinski receptor 1, C-reaktivni protein, čimbenik nekroze tumora  $\alpha$ , uzvodni transkripcijski faktor 1, skupinu diferencijacije 36 (CD36, *engl. cluster of differentiation 36*), glikogen-sintazu skeletnih mišića, 11  $\beta$ -hidroksisteroid-dehidrogenazu tip 1 (11 $\beta$ -HSD1), itd.<sup>70</sup> (Tablica 2).



Tablica 2. Geni kandidati povezani s metaboličkim sindromom

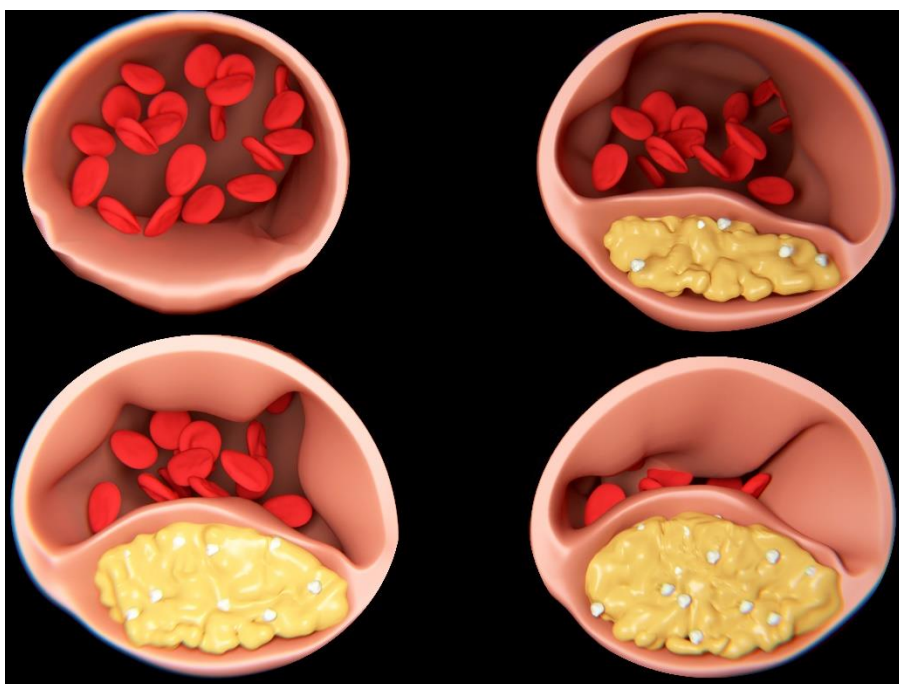
<b>GENI KANDIDATI</b>	
<b>GENI KOJI UZROKUJU MONOGENSKU PRETILOST</b>	leptin
	receptor za leptin
	receptor za melanokortin
	pro-opiomelanokortin (POMC)
<b>GENI KOJI REGULIRAJU METABOLIZAM SLOBODNIH MASNIH KISELINA</b>	adiponektin
	$\beta$ -adrenergički receptori
	protein-nosač masnih kiselina 2
	lipaze
	proteini razdvajanja
<b>GENI KOJI UTJEČU NA INZULINSKU OSJETLJIVOST</b>	receptor za aktivator proliferacije peroksisoma (PPAR)
	glikoprotein-1 plazma stanica
	supstrati inzulinskog receptora
	glikogen-sintaza 1 skeletnih mišića
	kalpain-10
<b>GENI KOJI UTJEČU NA METABOLIZAM LIPIDA</b>	skupina diferencijacije 36
	apolipoprotein E
	apolipoprotein A
	apolipoprotein C
	uzvodni čimbenik transkripcije 1
	11 $\beta$ -hidroksisteroid-dehidrogenaza tip 1
	receptor za aktivator proliferacije peroksisoma (PPAR)
<b>GENI POVEZANI S UPALNIM PROCESIMA</b>	čimbenik nekroze tumora $\alpha$
	C-reaktivni protein

### 2.1.3.8. OSTALI ČIMBENICI

Niže navedeni čimbenici povezani su s razvojem metaboličkog sindroma, ali još uvijek nemaju dijagnostički značaj.

#### 2.1.3.8.1. ENDOTELNA FUNKCIJA

Različiti čimbenici poput oksidacijskog stresa, hiperglicemije, slobodnih masnih kiselina, složenih produkata glikozilacije, upalnih citokina ili adipokina uzrokuju nemogućnost endotela da obavlja svoje normalne fiziološke i zaštitne mehanizme. Imunološke stanice igraju važnu ulogu u svim fazama procesa ateroskleroze.<sup>71</sup> (Slika 9)



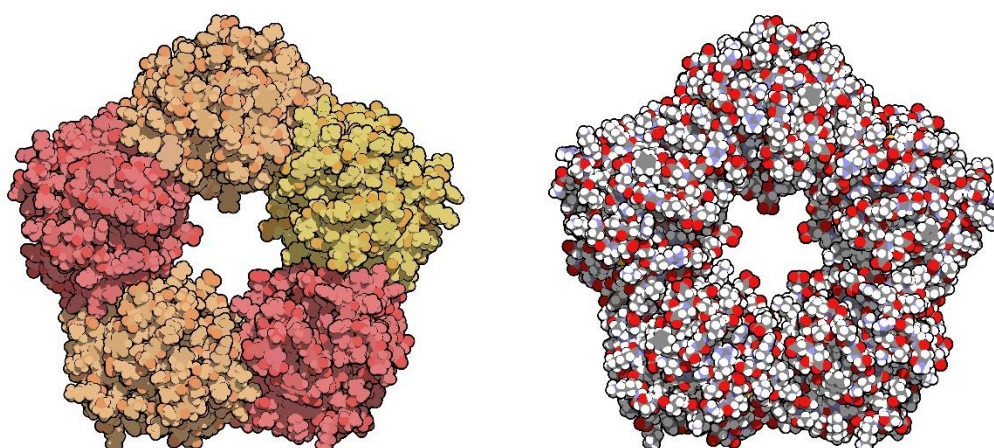
Slika 9. Razvojne faze ateroskleroze (preuzeto iz <sup>72</sup>)

Sniženje koncentracije dušikova(II) oksida, ključnog regulatora homeostaze endotela, te povišenje koncentracije reaktivnih kisikovih vrsta rezultira endotelnom disfunkcijom i proaterogenim žilnim koritom.<sup>73</sup>

### 2.1.3.8.2. C-REAKTIVNI PROTEIN (CRP)

C-reaktivni protein (CRP) po strukturi pripada obitelji pentraksina, kalcij-vežućih proteina sa svojstvima imunosne obrane. Građen je od pet istovjetnih, neglikoziliranih podjedinica sastavljenih od jedinstvenoga polipeptidnog lanca od 206 aminokiselina. Molekularna masa CRP-a je 118 kDa. Sintetizira se u jetri (u normalnim fiziološkim uvjetima 1-10 mg/dan, a u akutnoj upali > 1 g/dan) nakon indukcije s obitelji citokina IL-6, dok moguća sinteza izvan jetre ne pridonosi vrijednostima CRP-a u bolesnikovu serumu. Vrijednosti CRP-a u krvi mogu biti povećane i do 2000 puta. CRP djeluje u neadaptacijskom obrambenom mehanizmu, opsonizirajući i invadirajući mikroorganizme za fagocitozu. Ima svojstvo vezanja širokog raspona endogenih i egzogenih liganda, čime se olakšava njihovo uklanjanje iz tkiva i krvi. U prisutnosti kalcijevih iona CRP može vezati ne samo polisaharide prisutne u većini bakterija, gljivica i nekih parazita nego i produkte nekrotičnih i istrošenih stanica, kao i membranskih fragmenata (vezanjem npr. na fosforilkolin, lecitin, DNA), a u odsutnosti kalcijevih iona veže polikatione (npr. histone). Kada se poveže s jednim od liganada, CRP je sposoban aktivirati brojne biološke sustave, čiji je rezultat uklanjanje liganda procesima aktivacije komplementa, fagocitoze, makrofagima slezene koji čiste CRP presvučen ligandom, vezanjem CRP-a na specifične limfocite T i B i povećanjem aktivnosti NK-stanica (*engl. natural killer*). U organizmu se razgrađuje topljivim proteazama na mjestu upale.<sup>74</sup>

Povišena koncentracija C-reaktivnog proteina (Slika 10) povezana je s inzulinskom rezistencijom,<sup>75</sup> hiperglicemijom i većim opsegom struka,<sup>76</sup> te indeksom tjelesne mase.<sup>77</sup> Vrijednosti su češće povišene kod pretilih osoba s inzulinskom rezistencijom nego kod pretilih osoba s inzulinskom osjetljivošću.<sup>78</sup>



Slika 10. Trodimenzionalna struktura C-reaktivnog proteina. (preuzeto iz <sup>79</sup>)

A/ kalotni model s naglašenom strukturom homopentamera

B/ kalotni model u istoj orijentaciji

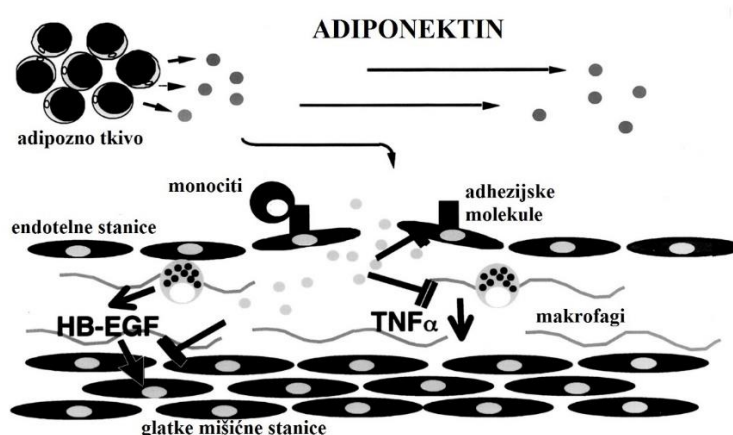
Nadalje, bez obzira na prisustvo ili stupanj metaboličkog sindroma u pojedinca, koncentracije CRP neovisno o tome predviđaju pojavnost kardiovaskularnih bolesti u budućnosti,<sup>80</sup> ili je već utvrđena pozitivna korelacija.<sup>81</sup> Budući da je metabolički sindrom povezan s mogućom pojavnosti kardiovaskularnih bolesti u budućnosti pojedinca,<sup>82</sup> koncentracije CRP mogle bi postati važni nezavisni prediktor neželjenih posljedica metaboličkog sindroma.

#### 2.1.3.8.3. HIPERKOAGULACIJSKO STANJE

Proupalno stanje karakteriziraju povišene vrijednosti citokina i reaktanata akutne faze (npr. C-reaktivnog proteina) u cirkulaciji. Protrombotičko stanje je patološko stanje organizma koje nagovještavaju anomalije prokoagulacijskih faktora, tj. povišenje koncentracija fibrinogena, faktora VII i faktora VIII, kao i antifibrinolitičkog faktora (PAI-1) te endotelna disfunkcija. Koncentracija fibrinogena i reaktanata akutne faze poput CRP, raste u odazivu na stanje visoke koncentracije citokina<sup>83</sup>, što pokazuje da bi protrombotska i proupalna stanja mogla biti metabolički povezana.

## 2.1.3.8.4. ADIPONEKTIN

Adipocitokin adiponektin, protein s ulogom hormona, sudjeluje u regulaciji metabolizma lipida i glukoze, povisuje inzulinsku osjetljivost, regulira unos hrane i tjelesnu masu, te djeluje protektivno protiv kronične upale. Cirkulira krvotokom u trimernom, heksamernom i obliku visoke molekulske mase. Koncentracije adiponektina u serumu u negativnoj su korelaciji s pretilosti, inzulinskom rezistencijom i ostalim metaboličkim poremećajima povezanim s debljinom.<sup>84</sup> Djeluje antiaterogeno, inhibira endotelnu aktivaciju, reducira promjenu makrofaga u pjenaste stanice, inhibira proliferaciju glatkih mišićnih stanica i pregradnju arterija koja karakterizira razvoj zrelih aterosklerotskih plakova.<sup>85</sup> (Slika 11) Adiponektin je obrnuto povezan s rizičnim čimbenicima za razvoj kardiovaskularnih bolesti kao što je visok krvni tlak, povišene koncentracije LDL-kolesterola i triacilglicerola.<sup>86, 87</sup>



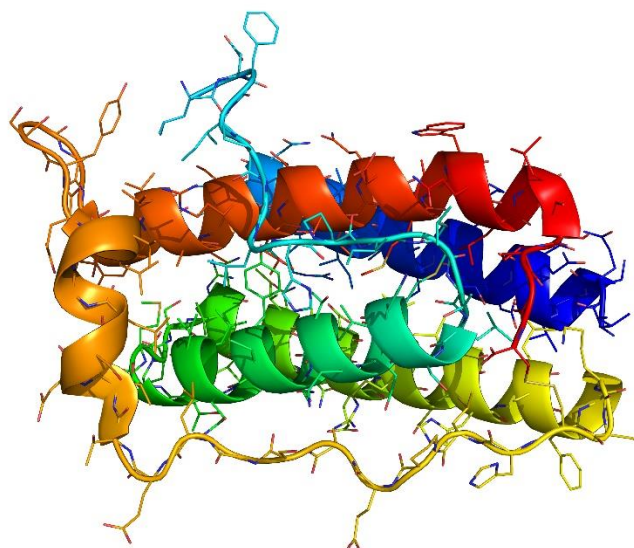
Slika 11. Molekularni mehanizam antiaterogenog djelovanja adiponektina

Adipozno tkivo izlučuje adiponektin koji se transportira u ozlijeđene arterije i štiti ih od razvoja aterogenih krvožilnih promjena. Kratice: HB-EGF - endotelni faktor rasta koji veže heparin, TNFα- čimbenik nekroze tumora α (prilagođeno prema <sup>85</sup>)

Ova protuupalna molekula u negativnoj je vezi s širim opsegom struka, tjelesnom masom i većim indeksom tjelesne mase, a pozitivna veza postoji s višom koncentracijom HDL-kolesterola.<sup>88, 89</sup> Ekspresiju i sekreciju adiponektina reduciraju čimbenik nekroze tumora α (TNFα)<sup>90</sup> i interleukin-6 (IL-6)<sup>91</sup>. Akumulacija adipocita dovodi do neregulirane proizvodnje adipokina, što pridonosi razvoju metaboličkog sindroma.<sup>92</sup>

#### 2.1.3.8.5. LEPTIN

Adipokin leptin (Slika 12) umiješan je u regulaciju sitosti i unosa energije.<sup>93</sup> Koncentracija leptina u plazmi povisuje se tijekom razvoja debljine i smanjuje prilikom gubitka težine. Receptori za leptin pretežito se nalaze u hipotalamusu i moždanom deblu, a signali kroz te receptore kontroliraju sitost, trošenje energije i neuroendokrine uloge. Većina pojedinaca s prekomjernom tjelesnom težinom i pretilo osobe imaju povišenu koncentraciju leptina koji ne guši apetit, tj. imaju rezistenciju na leptin. Pretpostavlja se da je rezistencija na leptin osnova patologije pretilosti.<sup>94</sup> Osim utjecaja na apetit i metabolizam, leptin djeluje u hipotalamusu kako bi se povisio krvni tlak putem aktivacije simpatičkog živčanog sustava.<sup>95</sup>



Slika 12. Trodimenzionalni vrpčasti prikaz strukture proteina leptina. (preuzeto iz <sup>96</sup>)

Budući da je koncentracija leptina u plazmi u korelaciji s debljinom, hiperleptinemija se uzima u razmatranje kao samostalan rizični čimbenik za kardiovaskularne bolesti.<sup>97</sup>

#### 2.1.3.8.6. INTERLEUKIN-6 (IL-6)

Interleukin-6 je citokin koji uz ostale uloge, ima ulogu u upalnim i protuupalnim procesima. Receptor za interleukin-6 eksplicira se i u određenim dijelovima mozga, kao što je hipotalamus, u kojem kontrolira apetit i unos energije.<sup>98</sup> Interleukin-6 primarno nastaje na

mjestima akutne i kronične upale a oslobađa ga adipozno tkivo i skeletni mišići.<sup>99</sup> Važna je determinanta proizvodnje C-reaktivnog proteina u jetri i stimulira njegov nastanak.<sup>100</sup> Suprimira aktivnost lipoprotein-lipaze i pozitivno je povezan s indeksom tjelesne mase,<sup>101</sup> koncentracijom inzulina natašte, razvitkom šećerne bolesti tipa 2,<sup>102</sup> a negativno je povezan s HDL-kolesterolom.<sup>103</sup> U pacijenata s metaboličkim sindromom, interleukin-6 i C-reaktivni protein značajno su povezani s indeksom tjelesne mase, opsegom struka i omjerom struk – bokovi.<sup>104</sup>

#### 2.1.3.8.7. INTERLEUKIN-10 (IL-10)

Interleukin-10 (IL-10) je predominantno protuupalni citokin koji ima ulogu u modulaciji upalnog procesa. Izlučuju ga monociti ili M2 makrofagi. Jedna od njegovih uloga je unaprijeđivanje normalnog oblikovanja tkiva nakon upalnog odgovora.<sup>104</sup> IL-10 ima antagonističko djelovanje onomu IL-6 i TNF- $\alpha$ .<sup>105, 106</sup>

Niske koncentracije IL-10 povezane su s inzulinskom rezistencijom i šećernom bolesti tipa 2. Nadalje, koncentracije IL-10 u obrnutoj su korelaciji s koncentracijama ukupnog kolesterola, LDL, triacilglicerola i glukoze u krvi, a pozitivno su povezane s koncentracijom HDL.<sup>107</sup> Koncentracije IL-10 povišene su u pretilih žena u usporedbi s koncentracijama u žena normalne tjelesne mase, ali koncentracije IL-10 značajno su niže i u pretilih žena i u žena normalne mase s metaboličkim sindromom.<sup>108</sup> U drugim istraživanjima koncentracije IL-10 bile su snižene i u žena i u muškaraca s metaboličkim sindromom.<sup>109, 110</sup>

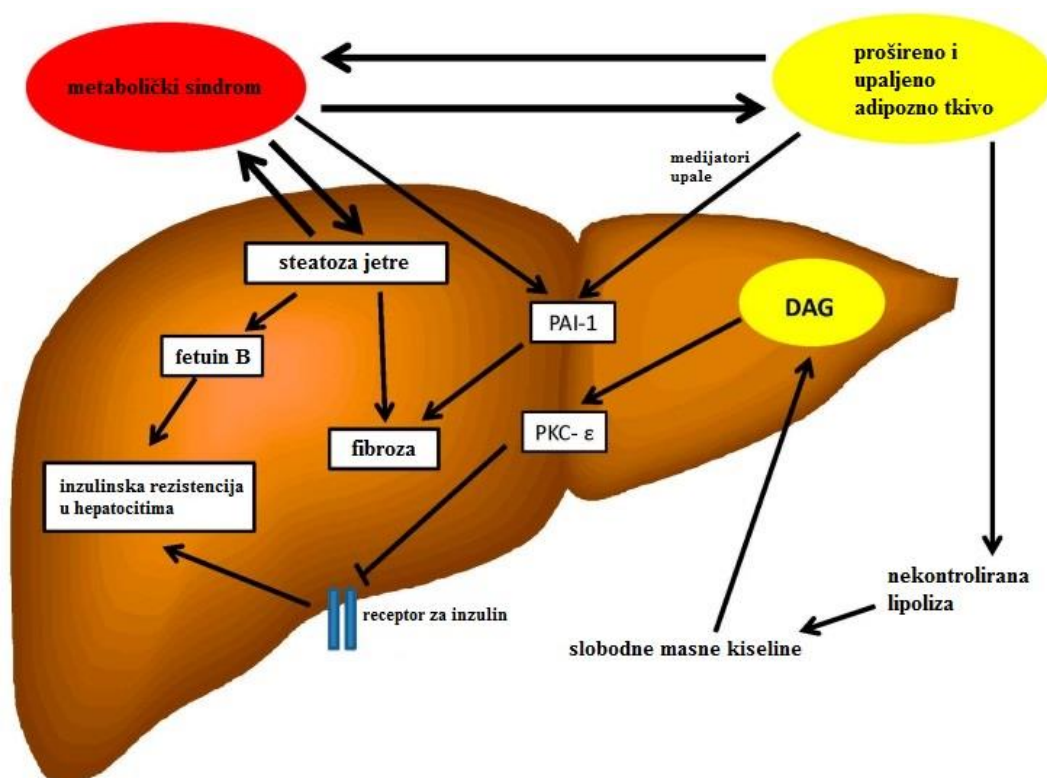
#### 2.1.3.8.8. INHIBITOR-1 AKTIVATORA PLAZMINOGENA (PAI-1)

Inhibitor-1 aktivatora plazminogena (PAI-1) u fiziološkim uvjetima izlučuje se u cirkulaciju ili vanstanični prostor iz unutar-abdominalnih adipocita, endotelnih stanica, krvožilnih glatkih mišićnih stanica, trombocita ili hepatocita.<sup>93</sup> U patološkim uvjetima PAI-1 je induciran mnogim proupalnim i prooksidacijskim čimbenicima. Primjerice, kada su povišene koncentracije čimbenika nekroze tumora  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta$  (TGF- $\beta$ , *engl. transforming growth factor beta*), angiotenzina II, glukokortikoida i inzulina, adipociti su stimulirani povišavati koncentraciju PAI-1. Hipoksija i reaktivne vrste kisika (ROS,

engl. *Reactive Oxygen Species*) također povišuju koncentraciju PAI-1. Tako povišene koncentracije PAI-1 posljedično utječu na krvne žile, signalizaciju upalnih procesa, debljinu i inzulinsku rezistenciju.<sup>111</sup>

Aberantne koncentracije PAI-1 povezane su s većim brojem patoloških bolesti. Visoke koncentracije u pozitivnoj su vezi s trombotičkim krvožilnim stanjima kao što je srčani udar i tromboza dubokih vena. Smatra se da su visoke koncentracije PAI-1 snažan čimbenik rizika za koronarne bolesti arterija, te su postojali prijedlozi da se njegove koncentracije koriste kao samostalan čimbenik za procjenu kardiovaskularnog rizika.<sup>112, 113</sup>

Veza između PAI-1 i metaboličkog sindroma je odavno utvrđena. Povišene koncentracije PAI-1 u snažnoj su korelaciji s metaboličkim sindromom (Slika 13).



Slika 13. Shematski prikaz interakcija između proširenog i upaljenog adipoznog tkiva, metaboličkog sindroma i steatoze jetara, te posredne uloge PAI-1. (prilagođeno prema <sup>116</sup>)  
Kratice: DAG: diacilgliceroli; PKC-ε: protein kinaza C-ε; PAI-1: inhibitor-1aktivatora plasminogena

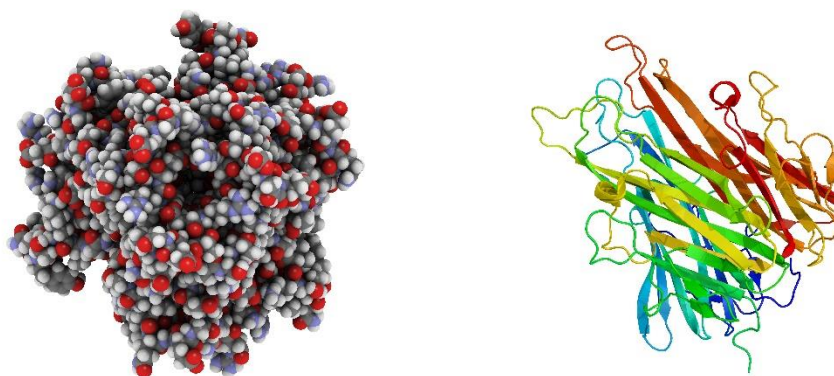
Kod težih oblika metaboličkog sindroma koncentracije PAI-1 su više.<sup>114, 115</sup> PAI-1 je snažno povezan s komponentama metaboličkog sindroma – indeksom tjelesne mase,



povišenom koncentracijom triacilglicerola i inzulinskom rezistencijom.<sup>111</sup> Koncentracije PAI-1 snižavaju se s gubitkom težine, restrikcijom kalorija, smanjenjem udjela tjelesnog masnog tkiva i poboljšanjem stanja inzulinske rezistencije,<sup>117, 118</sup> a rastu s povećanjem abdominalne pretilosti,<sup>119</sup> čime raste rizik od krvožilne tromboze i štetnih kardiovaskularnih ishoda.<sup>120</sup>

#### 2.1.3.8.9. ČIMBENIK NEKROZE TUMORA $\alpha$ (TNF $\alpha$ )

Čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  je proupalni citokin, parakrini medijator, kojeg izlučuje visceralno adipozno tkivo.<sup>121</sup> (Slika 14) Može djelovati lokalno i snižavati inzulinsku osjetljivost adipocita.<sup>93</sup> Budući da je česta karakteristika metaboličkog sindroma poremećena regulacija adipocita, takvi adipociti pokazuju tendenciju izlučivanja TNF $\alpha$ , IL-6 i drugih proupalnih adipokina u povišenim koncentracijama. Središnja pretilost kao sastavnica metaboličkog sindroma mogla bi biti čimbenik rizika za rast koncentracije TNF $\alpha$ .<sup>105</sup>



Slika 14. Trodimenzionalna struktura čimbenika nekroze tumora  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).

(lijevo – kalotni model; desno – vrpčasti prikaz) (preuzeto iz <sup>122</sup>)

TNF $\alpha$  bi mogao značajno pridonositi razvoju i progresiji bolesti povezanih s metaboličkim sindromom. U istraživanju s ispitanicima srednje životne dobi s metaboličkim sindromom, utvrđeno je da su povišene koncentracije TNF $\alpha$  i ostalih proupalnih citokina povezane s inzulinskom rezistencijom i hipertrigliceridemijom. Koncentracije TNF $\alpha$ , IL-6 i leptina u tih pacijenata su bile više nego u ispitanika iz kontrolne skupine, što indicira da su ovi citokini izravno povezani s metaboličkim sindromom.<sup>123</sup> TNF $\alpha$  je glavni autokrini/parakrini čimbenik koji pokreće lučenje slobodnih masnih kiselina (FFA) iz masnog tkiva u krvotok.<sup>124</sup>

U studiji metaboličkog sindroma u kojoj su sudjelovali ispitanici s koronarnom bolesti arterija (CAD, *engl. Coronary Artery Disease*), koncentracije TNF $\alpha$  bile su značajno više nego u kontrolnoj skupini.<sup>125</sup> I u drugim su istraživanjima povišene koncentracije TNF $\alpha$  značajno povezane s metaboličkim sindromom, kao i s inzulinskom rezistencijom.<sup>126</sup>

#### 2.1.3.8.10. GRELIN

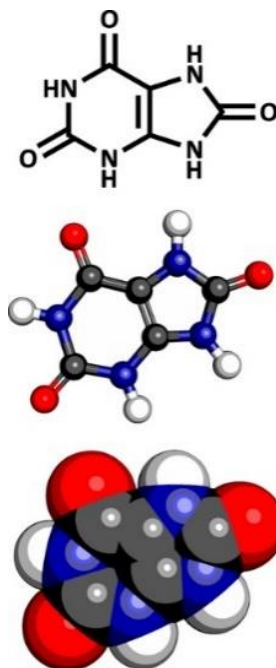
Grelin je neuroendokrini hormon koji se primarno izlučuje iz želuca te izravno stimulira tek (apetit) aktivacijom sekretagognog receptora 1a hormona rasta (receptora za grelin; GHSR; *eng. Growth hormone secretagogue receptor 1a*) u hipotalamusu, i neizravno povišenjem ekspresije oreksigenih peptida, kao što je neuropeptid Y (NPY).<sup>127, 128</sup> Budući da je antagonist vazokonstriktora poput endotelina 1, a unaprijeđuje učinke vazodilatatora poput dušikova(II) oksida,<sup>129</sup> grelin može djelovati protektivno na krvne žile. Grelin promiče lipolizu putem stimulacije protein-kinaze aktivirane AMP-om (AMPK, *engl. AMP-activated protein kinase*).<sup>128</sup>

Metabolički sindrom povezan je s nižim koncentracijama grelina. Progresivno snižavanje koncentracije grelina povezano je s povećanjem ozbiljnosti metaboličkog sindroma. Koncentracija grelina je viša u žena nego u muškaraca,<sup>130</sup> a smanjuje se s porastom broja rizičnih čimbenika.<sup>130, 131</sup> Niske koncentracije grelina povezane su s pretilosti, inzulinskom rezistencijom i hipertenzijom.<sup>132, 133, 134</sup> Povezanost metaboličkog sindroma i niske koncentracije grelina objašnjava se prvenstveno odnosom sindroma s pretilosti, budući da pretili pacijenti s metaboličkim sindromom imaju niže koncentracije grelina od nepretilih ispitanika.<sup>135</sup> Među pretilim pacijentima, koncentracije grelina su niže u inzulin-rezistentnih pacijenata, u usporedbi s inzulin-osjetljivim pretilim pacijentima.<sup>136</sup> Navedena povezanost grelina s komponentama metaboličkog sindroma čini ga djelotvornim biomarkerom metaboličkog sindroma.

#### 2.1.3.8.11. MOKRAĆNA KISELINA

Mokraćna kiselina je endogeni produkt terminalne degradacije produkata katabolizma purina (Slika 15).

Nastaje u jetri, primarno se izlučuje se bubrezima, a sekundarno intestinalnim traktom.



Slika 15. Struktura mokraćne kiseline.

(na vrhu - strukturna formula; u sredini – kuglasto-štapicaсти model; na dnu – kalotni model) (preuzeto iz <sup>137</sup>)

Izvan stanica mokraćna je kiselina u topljivom obliku, pokazuje antioksidacijski kapacitet i može biti odgovorna za 2/3 antioksidacijskog kapaciteta plazme, gdje kelira metale i veže radikale kisika (reaktivne oblike kisika). Za antioksidacijsko djelovanje mokraćne kiseline u plazmi, tj. za uklanjanje reaktivnih oblika kisika, nužno je prisustvo askorbinske kiseline (vitamina C). Mokraćna kiselina reagira i s reaktivnim oblicima dušika, primjerice s peroksinitritom. Međutim, unutar stanica ima pro-upalnu i prooksidacijsku aktivnost djelujući na put ovisan o NADPH-oksidazi. Mokraćna kiselina je cirkulirajući marker za oksidacijska oštećenja u uvjetima ishemične jetre, ateroskleroze, dijabetesa i kroničnog zatajenja srca.<sup>138</sup> Kao pro-oksidans, u ishemičnim uvjetima ili kao rezultat oštećenja tkiva, mokraćna kiselina oksidira lipide, što rezultira upalom koja ometa povratni transport kolesterola.<sup>139</sup> Isto tako mokraćna kiselina smanjuje raspoloživost dušikova(II) oksida, što rezultira smanjenom vazodilatacijom i većim brojem različitih reaktivnih vrsta kisika. Hiperurikemija ili hiperuricemija (koncentracija mokraćne kiseline u plazmi > 0,41 mmol/L)<sup>140</sup> je dobro poznat

čimbenik rizika za aterosklerotičke događaje kao što su srčani i moždani udar, i povezana je s drugim kardiovaskularnim čimbenicima rizika kao što su hipertenzija i dislipidemija. Pronađena je pozitivna povezanost između mokraćne kiseline i indeksa tjelesne mase, krvnog tlaka i triacilglicerola, a negativna korelacija s HDL-kolesterolom.<sup>141</sup> Koncentracija mokraćne kiseline u serumu značajno je povišena u muškaraca i žena s abdominalnom pretilosti, niskom koncentracijom HDL-kolesterola i hipertenzijom.<sup>142</sup> U nekoliko studija otkriveno je da je koncentracija mokraćne kiseline značajno povišena u ispitanika s metaboličkim sindromom, da raste s brojem sastavnica sindroma i da je pokazatelj lošeg profila kardiovaskularnog rizika.<sup>142, 143, 144</sup> Procijenjeno je da osobe s visokom koncentracijom mokraćne kiseline u serumu imaju 1,6 puta veći izgled za razvoj metaboličkog sindroma.<sup>145</sup> Bliska veza između mokraćne kiseline i prisutnosti metaboličkog sindroma dokazana je u djece, adolescenata i odraslih osoba.<sup>146</sup>

#### 2.1.3.8.12. OKSIDIRANI LIPOPROTEINI NISKE GUSTOĆE (oxLDL)

Oksidirani lipoproteini niske gustoće (oxLDL; *engl. Oxidized LDL*) su produkti oksidacije lipida i mogu služiti kao marker oksidacijskog stresa. Oksidacija lipida doprinosi stvaranju reaktivnih vrsta kisika (ROS, *engl. Reactive Oxygen Species*), koje su komponente oxLDL. Proizvodi oksidacije lipida ROS i oxLDL u niskim koncentracijama mogu poslužiti kao signalne komponente za puteve staničnih antioksidansa, koji uključuju Hem-oksigenazu (HO-1; *engl. Heme Oxygenase*) i glutation. Međutim, ako je antioksidacijski kapacitet stanica nedjelotvoran, kao što se često vidi u metaboličkom sindromu, onda ti spojevi pridonose oksidacijskoj kaskadi koja eventualno vodi do oštećenja stanice i apoptoze.<sup>147</sup> To rasprostranjeno oštećenje stanica i stanična smrt mogu doprinijeti krvožilnoj disfunkciji često viđenoj u metaboličkom sindromu, dok disfunkcionalni oxLDL može dodatno doprinijeti dislipidemiji, predstavljajući čimbenik rizika za kardiovaskularne bolesti, bolesti koje su uobičajeno povezane s metaboličkim sindromom. OxLDL doprinosi aterosklerozi oštećivanjem endotela krvnih žila.<sup>148</sup> Povišene koncentracije oxLDL u odraslih povezane su s debljinom i inzulinskom rezistencijom, dvjema zajedničkim komponentama metaboličkog sindroma.<sup>149</sup> Istraživanja su pokazala da su koncentracije oxLDL značajno povišene u ispitanika s metaboličkim sindromom, a te povišene koncentracije dodatno su povezane sa smanjenjem arterijske elastičnosti, čimbenikom rizika za koronarnu bolest arterija.<sup>148, 150</sup> Povišene

koncentracije oxLDL povezane su s hiperglicemijom, hipertrigliceridemijom i pretilosti središnjeg dijela tijela – sastavnicama metaboličkog sindroma.<sup>151</sup>

#### 2.1.3.8.13. PARAOKSONAZA-1 (PON-1)

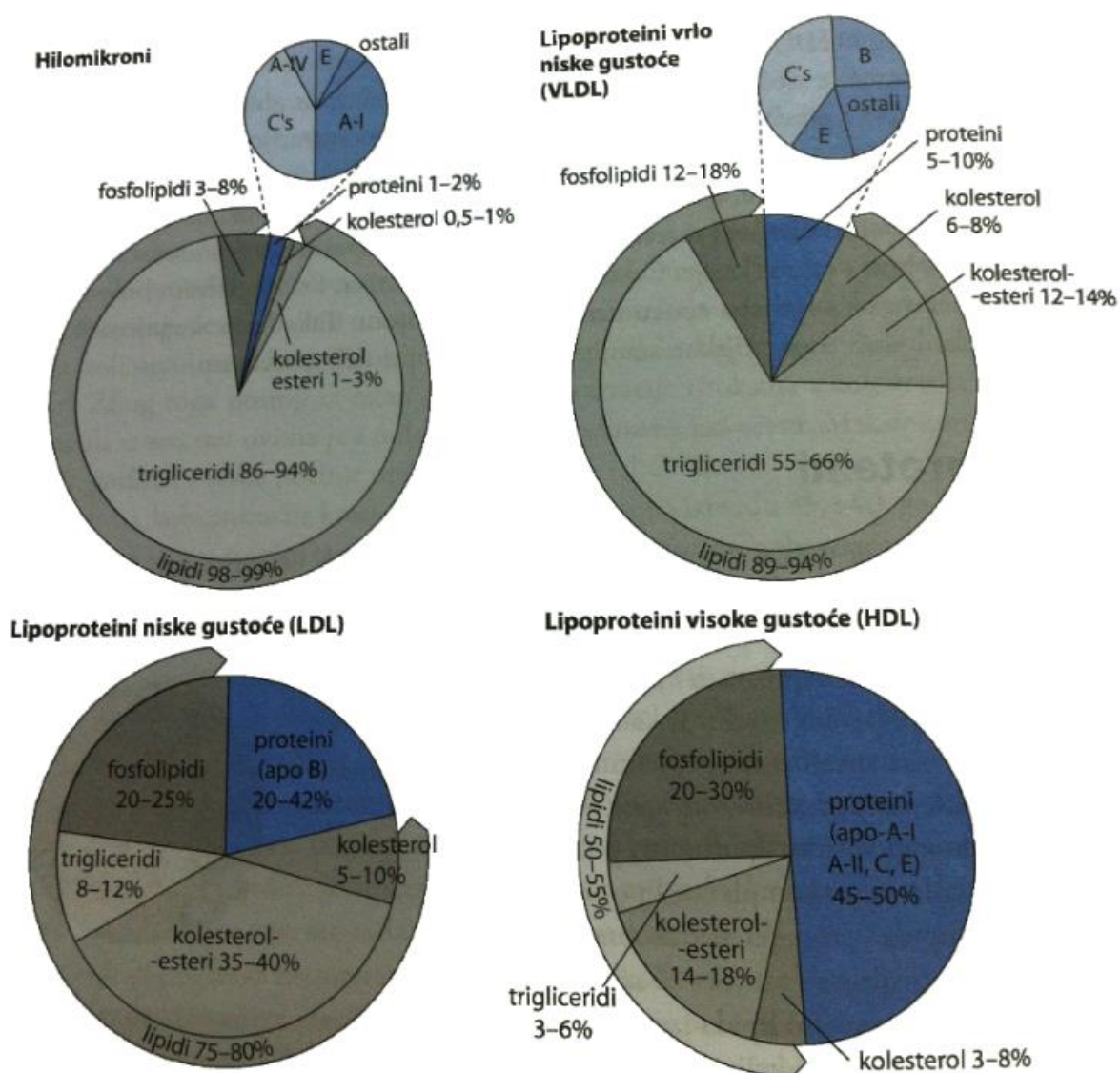
Glikoprotein paraoksonaza-1 (PON-1) je antitoksičan i antioksidacijski enzim koji sudjeluje u uklanjanju radikala lipidne peroksidacije a član je skupine serumskih paraoksonaza, koju osim paraoksonaze-1 još čine paraoksonaza-2 i paraoksonaza-3. Posjeduje esteraznu i paraoksonaznu aktivnost.<sup>152</sup>

PON-1 se sintetizira u jetri, a uglavnom je u cirkulaciji povezana s lipoproteinima visoke gustoće (HDL) te pridonosi njihovim antioksidacijskim i protuupalnim svojstvima.<sup>153, 154</sup> Enzim smanjuje lipidnu peroksidaciju i štiti lipoproteine niske gustoće (LDL) i tkivo od oksidacijskog stresa.<sup>155</sup> Aktivnost PON-1 u korelaciji je s antitoksičnim i antioksidacijskim kapacitetom sustava, dok su oksidacijski stres i lipidna peroksidacija povezani s nastankom i progresijom metaboličkog sindroma i nekih njegovih bolesnih stanja, naročito krvožilne disfunkcije (koja proizlazi iz oksLDL).<sup>148</sup> Zbog svojih antioksidacijskih svojstava, PON-1 može igrati ulogu u upravljanju normalnim oksidacijskim signalnim putem i to bi moglo poslužiti kao koristan biomarker u procjeni antioksidacijskog kapaciteta.

U istraživanju koje je provedeno među vitkim adolescentima, adolescentima s prekomjernom tjelesnom masom i pretilim adolescentima, snižene koncentracije PON-1 povezane su s centralnim tipom debljine i metaboličkim sindromom. Nadalje, niže koncentracije PON-1 povezane su s hipertenzijom, hipertrigliceridemijom, inzulinskom rezistencijom, smanjenom tolerancijom glukoze i povišenim oksidacijskim stresom.<sup>153</sup> U studiji provedenoj s ispitanicima ženskog spola s i bez metaboličkog sindroma, aktivnost PON-1 u serumu značajno je snižena u žena s koronarnom bolesti arterija i metaboličkim sindromom.<sup>155</sup>

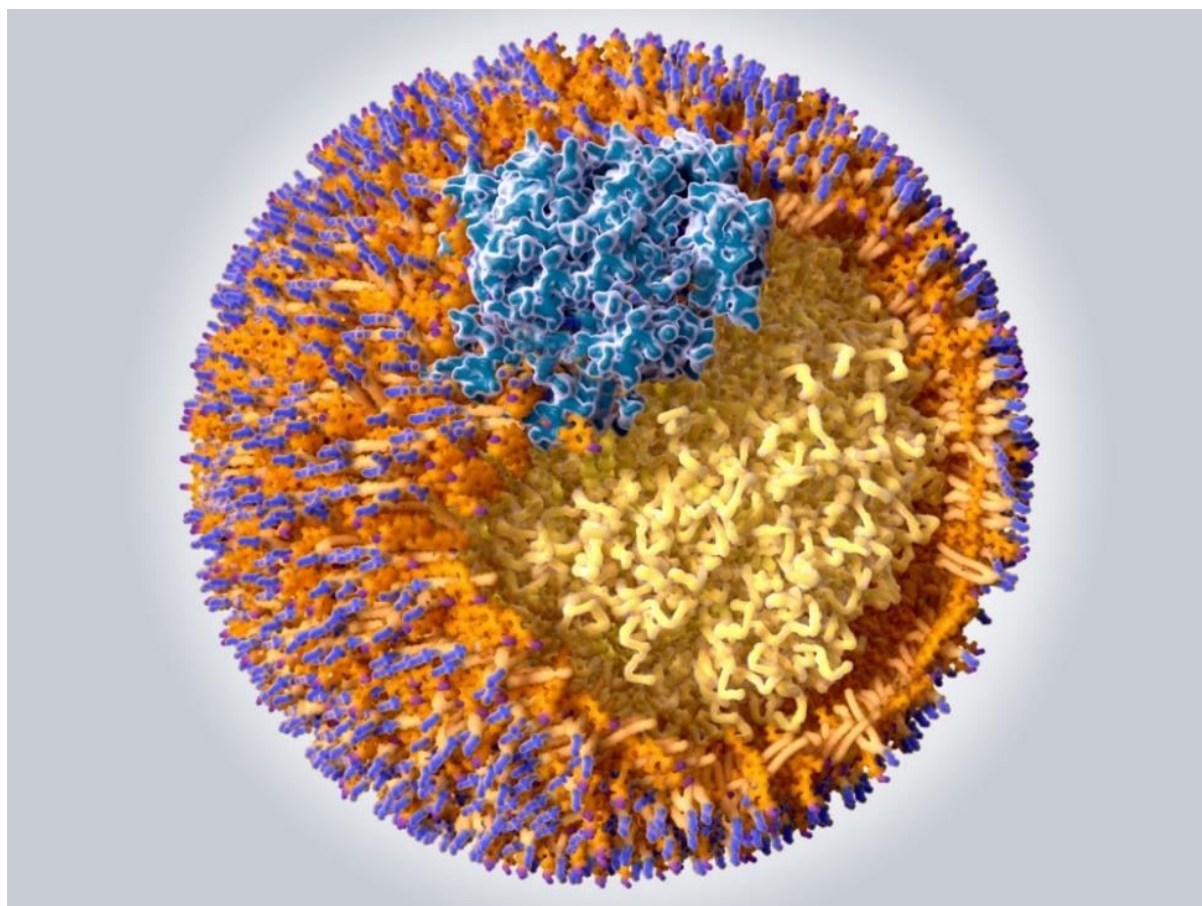
## 2.2. LIPOPROTEINI

Lipoproteini su čestice sastavljene od lipida i proteina, pogodne za transport lipida u krvi i limfi do svih stanica organizma. Sferičnog su oblika u čijem su središtu hidrofobni nepolarni lipidi, koje okružuju polarniji lipidi i specifični proteini. Prema rastućoj gustoći (većem udjelu proteinskih sastavnica u kvantitativnom odnosu lipida i proteina) (Slika 16),



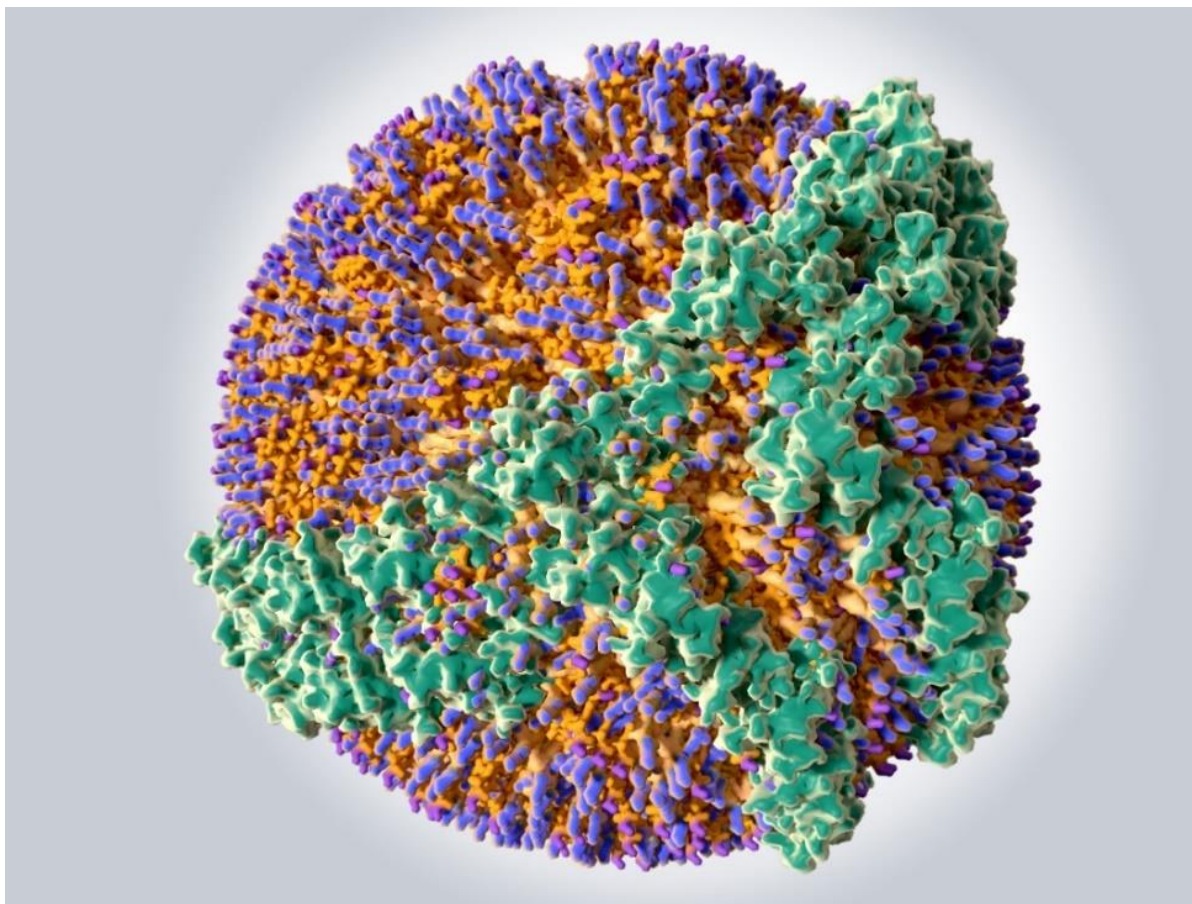
Slika 16. Sastav lipoproteinskih čestica (prilagođeno prema <sup>156</sup>)

dijele se na hilomikrone, ostatne hilomikrone, lipoproteine vrlo niske gustoće (VLDL, *engl. very low-density lipoproteins*), lipoproteine niske gustoće (LDL, *engl. low-density lipoproteins*) (Slika 17), lipoproteine srednje gustoće (IDL, *engl. intermediate-density lipoproteins*) i lipoproteine visoke gustoće (HDL, *engl. high-density lipoproteins*) (Slika 18). Sve vrste lipoproteina u svom sastavu imaju fosfolipide, triacilglicerole, kolesterol i estere kolesterola.



Slika 17. Modelni prikaz lipoproteina niske gustoće (LDL)

ApoB 100 (plavo), fosfolipidi (narančasto s plavim vrhom), kolesterol (narančasto s ljubičastim vrhom), trigliceridi i esteri kolesterola (žuto) (preuzeto iz <sup>157</sup>)



Slika 18. Modelni prikaz lipoproteina visoke gustoće (HDL)  
Apolipoprotein ApoA (zeleno), fosfolipidi (narančasto s plavim vrhom), kolesterol  
(narančasto s ljubičastim vrhom) (preuzeto iz <sup>158</sup>)

### 2.2.1. APOLIPOPROTEINI (APOPROTEINI)

Apolipoproteini (apoproteini) predstavljaju proteinsku sastavnicu lipoproteinskih čestica. Njihova je uloga višestruka: imaju strukturnu funkciju (proteini koji su sastavni, površinski dio lipoproteinskih čestica), ulogu aktivatora ili kofaktora enzima koji sudjeluju u metabolizmu lipoproteina, ulogu liganada u vezanju lipoproteina za specifične receptore i dr. Poznato je jedanaest različitih apolipoproteina: apo-A-I, apo-A-II, apo-A-IV, apoAV, apo-B-100, apo-B-48, apo-C-I, apo-C-II, apo-C-III, apo-E i apo(a).<sup>159</sup> Manji, zamjenjivi članovi te obitelji evoluirali su iz jednog evolucijski očuvanog gena i nadziru različite procese u intravaskularnom transportu lipida.<sup>160</sup> Istraživanja strukture i uloge članova obitelji zamjenjivih apolipoproteina bila su instrument u rasvjetljavanju njihovih bioloških uloga i mehanizama



kojima reguliraju metabolizam lipida.<sup>161</sup> Zamjenjivi apolipoproteini, sastavljeni uglavnom od amfipatskih  $\alpha$  – uzvojnica, u stanju su disocirati s jednog lipoproteina i ponovno se povezati s drugim lipoproteinom u cirkulaciji.

### 2.2.1.1. APOLIPOPROTEIN A5 (*ApoA5*; *Apo A-V*; *RAP3*)

Apolipoprotein A5 (*ApoA5*; *Apo A-V*; *RAP3*) je otkriven kao rezultat istraživanja novih okvira čitanja skupine gena za *ApoA-I/ApoC-III/ApoA-IV* na kromosomu 11q23 (Slika 19). Otkriven je neovisno u dva tima: Pennacchio i sur.<sup>162</sup> i van der Vliet i sur.<sup>163</sup> uspoređivanjem humanog genoma i genoma miša, kao posljednji otkriven protein u apo A skupini proteina. Zreli humani apolipoprotein A5 je protein od 39 kDa i 343 aminokiselinska ostatka, a 27% sekvence identično je humanom apolipoproteinu A-IV.<sup>164</sup> Vrlo je hidrofoban i posjeduje karakteristike tipične za zamjenjive apolipoproteine, uključujući visok udio  $\alpha$ -uzvojnica.<sup>163</sup>



Slika 19: Kromosom 11q23 i smještaj gena za *ApoA-I/ApoC-III/ApoA-IV/ApoA5* (prilagođeno prema <sup>165</sup>)

Dvije najznačajnije uloge *ApoA5* uključuju održavanje koncentracije cirkulirajućih triacilglicerola u plazmi povećanjem katabolizma lipoproteina bogatih triacilglicerolima i inhibiranjem brzine nastanka lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL) koji su najznačajniji prenositelji triacilglicerola,<sup>166</sup> te njegova sastavna uloga u hepatičkim lipidnim kapljicama.

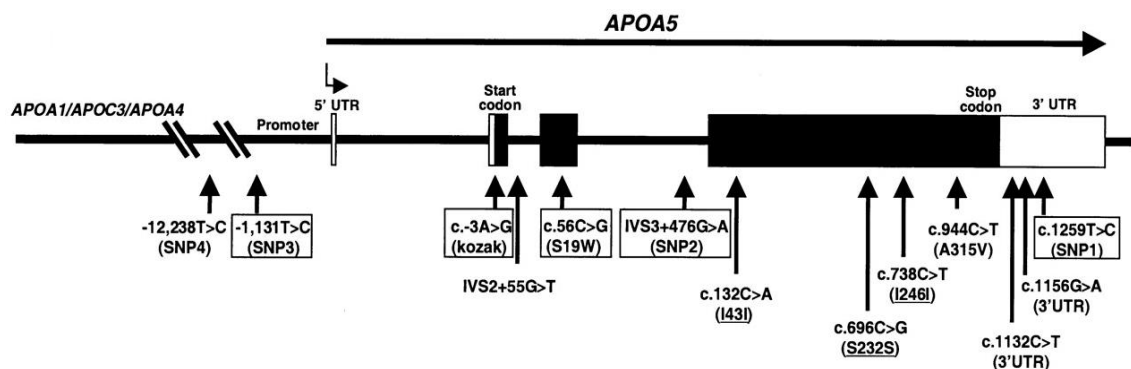
*ApoA5* se eksprimira u jetrima i izlučuje u plazmu. Ima važnu ulogu u metabolizmu lipida, naročito u lipoproteinima bogatim trigliceridima. Ova apolipoproteinska čestica detektibilna je u VLDL, HDL i hilomikronima, ali ne u LDL lipoproteinima. Mehanizam djelovanja apolipoproteina A5 nije u potpunosti razjašnjen. Njegove su koncentracije izrazito

niske<sup>167</sup> - koncentracija ApoA5 u plazmi kreće se u rasponu od 24 do 406 µg/L Apo A5,<sup>168</sup> što je do 2000 puta niža koncentracija u odnosu na druge apolipoproteine, primjerice na ApoC-III i ApoA-I (približno 1 g/L Apo A-I)<sup>169</sup> ili < 0,1 % Apo A-I<sup>163</sup> što objašnjava kasno otkriće ovog apolipoproteina. Koncentracija ApoA5 u plazmi određena je DAS-ELISA testom (*engl. double antibody sandwich ELISA*).<sup>168</sup>

Vjerojatnija je mogućnost da ApoA5 utječe na koncentraciju triglicerida u plazmi modulirajući sklapanje VLDL u jetri i njegovu sekreciju, nego na intravaskularni metabolizam lipoproteina bogatih trigliceridima.<sup>164</sup> Povezanost ApoA5 s lipidnim kapljicama u citoplazmi i njegov utjecaj na intrahepatičku akumulaciju triglicerida kao i na intravaskularni metabolizam triglicerida, upućuje na ulogu ApoA5 unutar stanice. Budući da adipociti u najvećoj mjeri osiguravaju skladištenje energije u obliku triglicerida unutar lipidnih kapljica, te igraju ključnu ulogu u razvoju pretilosti, novijim se istraživanjima ističe interakcija ApoA5 s adipocitima ili adipoznim tkivom, te indicira da ApoA5 može djelovati kao novi regulator koji modulira pohranu triglicerida u adipocitima.<sup>170</sup>

#### 2.2.1.2. STRUKTURA GENA APOA5 I LOKACIJA POLIMORFIZAMA

Gen za apolipoprotein A5 je maleni gen od približno 3000 parova baza, lociran na kromosomu 11. Sastavljen je od četiri egzona i tri introna, a kodira protein od 366 aminokiselina (signalni peptid čine 23 aminokiseline, dok 343 aminokiseline sadrži zreli protein ApoA5). Transkripcija gena prikazana je na slici 20 velikom horizontalnom strelicom. Egzoni su prikazani pravokutnicima, sa zacrnjenim područjima koja odgovaraju otvorenom okviru čitanja i kodiraju protein. Položaj i naziv polimorfizama jednog nukleotida (*engl. SNP, single nucleotide polymorphisms*) prikazani su ispod shematskog prikaza. Polimorfizmi jednog nukleotida pronađeni unutar otvorenog okvira čitanja prikazuju predviđenu supstituciju aminokiselina i navedeni su u zagradama. Do danas je otkriveno 147 polimorfizama jednog nukleotida za gen *APOA5* ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/\(search term=Human APOA5\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/(search%20term=Human%20APOA5))),<sup>171</sup> međutim, za većinu ne postoje značajni podatci o njihovom funkcionalnom značaju.



Slika 20. Gen za apolipoprotein A5 (gen *APOA5*) i smještaj polimorfizama gena (prilagođeno prema <sup>172</sup>)

Tri najčešća haplotipa povezana s genom *APOA5* su *APOA5\*1*, *APOA5\*2* i *APOA5\*3*, a uključuju pet tipičnih *APOA5* polimorfizama jednog nukleotida: polimorfizam *-1131 T>C* lociran je u promotorskoj regiji i povezan s povišenom koncentracijom triacilglicerola u različitim populacijskim grupama,<sup>173</sup> drugi od značajnijih polimorfizama jest supstitucija tri nukleotida uzvodno od inicijacijskog kodona (*-3 A>G*), supstitucija *56 C>G* u kodirajućoj regiji za signalni peptid (u literaturnim navodima ovaj je polimorfizam poznat i pod nazivom *S19W*), a također je povezan s visokim koncentracijama triacilglicerola,<sup>161</sup> *IVS+476 G>A* i *1259 T>C*.

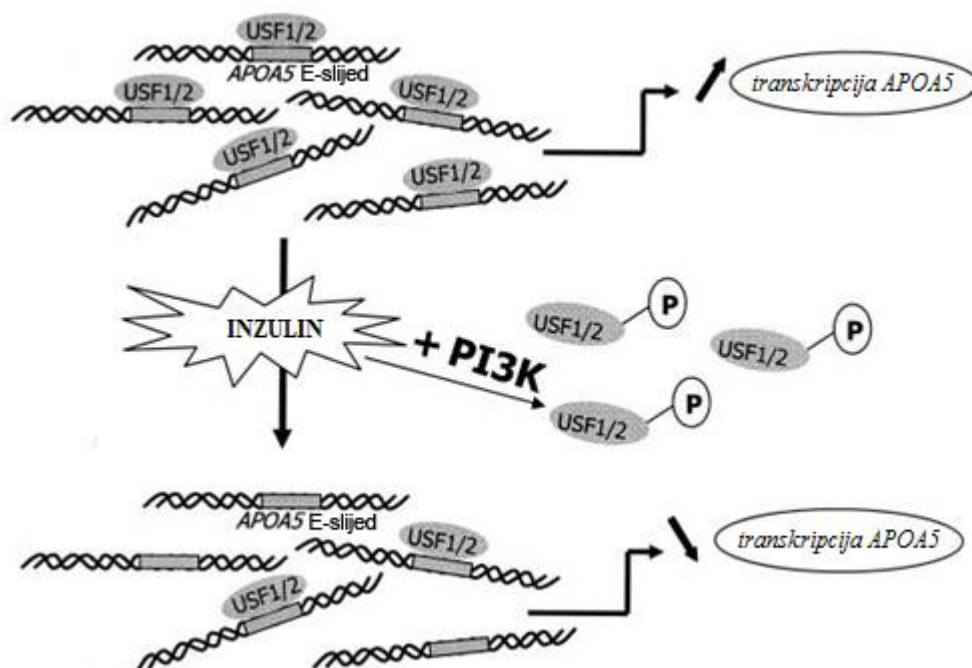
*56 C>G* pojavljuje se s frekvencijom 14,4% u pacijenata s koronarnom bolesti arterija.<sup>174</sup> Polimorfizam *553 G>T* u kodirajućoj regiji kojim se zamjenjuje cistein glicinom na poziciji 162 zrelog ApoA5 povezan je s hipertrigliceridemijom kod azijske populacije.<sup>175</sup> Određena istraživanja ukazuju na moguću važnu ulogu polimorfizma s glicinom 162 u hidrolizi VLDL-a posredovanoj lipoprotein-lipazom.<sup>176</sup>

Česti (divlji) aleli su (*-1131 T*, *-3 A*, *IVS+476 G* i *1259 T*), a rijetki (*-1131 C*, *-3 G*, *IVS+476 A* i *1259 C*). Njihovim kombinacijama definirani su slijedeći haplotipovi: *APOA5\*1* predstavlja divlji tip haplotipa i definiran je čestim alelima u svih pet SNP-ova. Drugi haplotip, *APOA5\*2*, uključuje jedan SNP s učestalim alelom (*56C<G*) i četiri SNP-a s rijetkim alelima (*-1131 T>C*, *-3 A>G*, *IVS+476 G>A* i *1259 T>C*). Treći tip haplotipa, *APOA5\*3*, je obrnuti oblik haplotipa *APOA5\*2*, u smislu da SNP *56C>G* predstavlja rijetke alele a ostala četiri česte alele.<sup>177, 178</sup> Frekvencije tih haplotipova u populaciji bijelaca iznose 69% za *APOA5\*1* i 4% za haplotipove *APOA5\*2* i *APOA5\*3*.<sup>179</sup> Od kliničkog značaja i relevantni za metabolizam triacilglicerola su SNP-ovi, *APOA5\*2* i *APOA5\*3*; za rijetke alele od oba haplotipa istraživanja su pokazala da povisuju koncentraciju triacilglicerola u plazmi. Promjene nukleotidnih baza

evidentno rezultiraju promjenama u slijedu aminokiselina u molekuli ApoA5 što dovodi do konformacijskih promjena u proteinu. Posljedično, funkcionalnost konačnog produkta ApoA5 se mijenja što dovodi do disfunkcionalnog proteina ili proteina sa smanjenom aktivnosti.<sup>166</sup>

### 2.2.1.2.1. REGULACIJA GENA APOA5

Nekoliko je nuklearnih receptora uključeno u ekspresiju gena *APOA5*. To uključuje uzvodne i nizvodne regulatore. Od uzvodnih regulatora najznačajniji su transkripcijski faktori: receptor za aktivator proliferacije peroksisoma  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ , engl. *peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$* ) i farnezoidni X receptor (FXR, engl. *farnesoid X receptor*),<sup>180</sup> zatim ROR receptor (engl. *retinoid acid receptor - related orphan receptor*),<sup>181</sup> hepatocitni nuklearni čimbenik 4 (HNF4, engl. *hepatocyte nuclear factor 4*)<sup>182</sup> i orfan receptor Nur77 (NR4A1)<sup>183</sup>. Jetreni receptor X (LXR, engl. *liver X receptor*)<sup>184</sup> i inzulin<sup>185</sup> (Slika 21.) su nizvodni regulatori ekspresije gena *APOA5*. Pretile osobe i pacijenti sa šećernom bolesti (diabetes mellitusom) imaju niže koncentracije ApoA5 u plazmi u usporedbi sa zdravim ispitanicima (kontrolnom skupinom).<sup>186, 187, 188</sup>



Slika 21. Shematski prikaz predloženog modela djelovanja inzulina na ekspresiju gena *APOA5* i uloge uzvodnih faktora regulacije USF1 (engl. *upstream regulatory factor 1*) i USF2 (engl. *upstream regulatory factor 2*) na transkripciju gena *APOA5*.

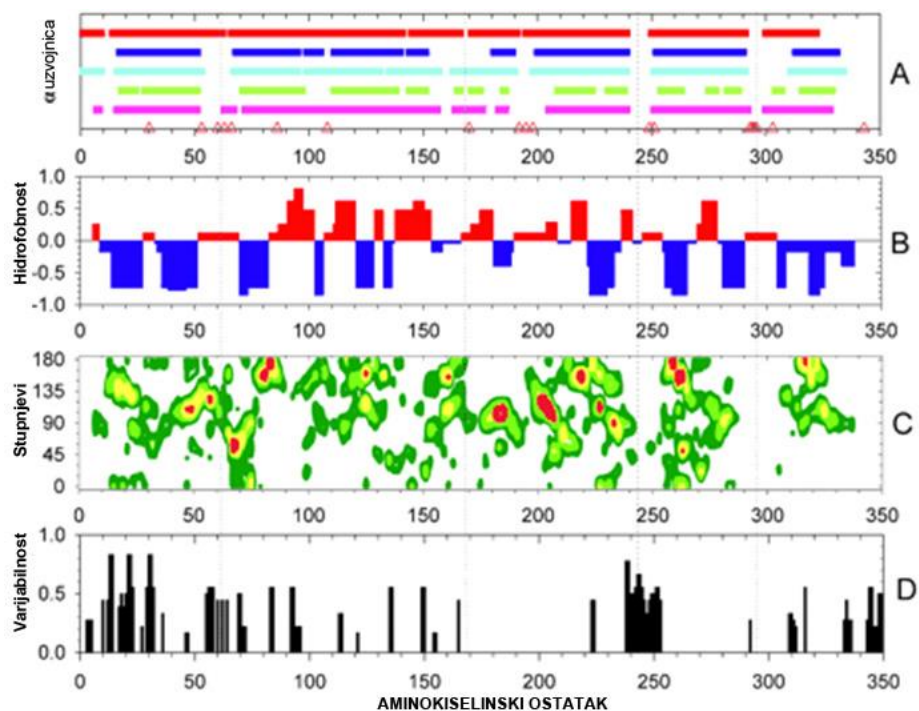
Inzulin stimulira PI3K put, inducirajući fosforilaciju USF. Fosforilirani kompleksi gube sposobnost vezanja za *APOA5* promotor i posljedično, transaktivacijsko djelovanje. (prilagođeno prema <sup>185</sup>)

Pretpostavlja se da je regulacija ApoA5 hiperinzulinemijom važan mehanizam u ovih pacijenata. Eksperimentalno inducirana hiperinzulinemija značajno je reducirala koncentraciju ApoA5 u plazmi zdravih ispitanika, a ekspresija gena ovisi o dozi inzulina.<sup>185</sup> Promjene u ekspresiji i/ili aktivnosti nuklearnih receptora koji reguliraju ekspresiju gena *APOA5* mogle bi pridonijeti sniženju koncentracije ApoA5 u pacijenata s metaboličkim sindromom. Reducirana ekspresija jetrenog PPAR $\alpha$  uočena je u pretilih štakora s rezistencijom na inzulin.<sup>189</sup>

### 2.2.1.3. STRUKTURA APOLIPOPROTEINA A5

Karakterizacijska istraživanja indiciraju da ApoA5 ima jedinstvena strukturalna svojstva.<sup>173, 190</sup> Analiza sekvence apolipoproteina A5 potpomognuta računalnom analizom (Slika 22.) predviđa hidrofobnu strukturu proteina, koja sadrži značajni udio sekundarne strukture u obliku  $\alpha$ -uzvojnica i vjerojatno je sastavljena od odvojenih strukturalnih područja s varijabilnim afinitetom za lipide. Predviđanje je potvrđeno spektroskopskom analizom cirkularnog dikroizma u ultraljubičastom području.<sup>191</sup>

Preprotein se sintetizira u jetri i sadržava 366 aminokiselinskih ostataka. Nakon unutarstaničnog cijepanja signalnog peptida od 23 aminokiselinskih ostataka, zreli protein ApoA5 (koji sadržava 343 aminokiselinskih ostataka) ulazi u sekretorni put i ulazi u plazmu, ili se povezuje s citosolnim lipidnim kapljicama.<sup>173</sup> Računalnim analizama izračunata molekularna masa proteina je 38905 Da.<sup>164</sup>



Slika 22. Računalne analize položaja aminokiselina u humanom apolipoproteinu A5 (prilagođeno prema <sup>164</sup>)

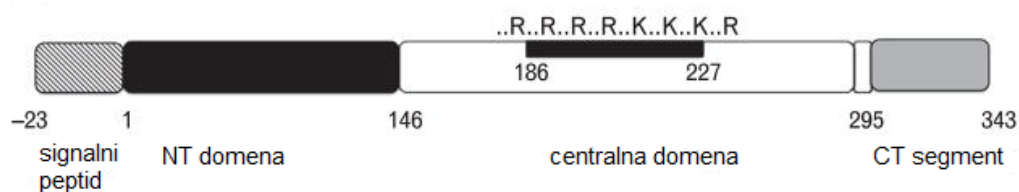
A vjerojatnost  $\alpha$ -uzvojnica  $>1.0$ , računato (od dna prema vrhu) po algoritmima Chou-Fasman, Garnier, NNSSP, Predator, i PHD. Otvoreni crveni trokuti označavaju lokaciju prolinskih ostataka.

B, srednja vrijednost hidrofobnosti

C, Fourierova transformacija srednje vrijednosti hidrofobnog momenta uzvojnice (*bijelo*, 0–4.49 kcal/mol; *tamno zeleno*, 4.50–5.99 kcal/mol; *svjetlo zeleno*, 6.00–6.99 kcal/mol; *žuto*, 7.00–7.99 kcal/mol; *crveno*,  $>8.00$  kcal/mol) kut rotacije ostatka duž primarnog slijeda

D, varijabilnost aminokiselina u sljedovima humanog apolipoproteina A5, apolipoproteina A5 štakora i apolipoproteina A5 miša

Slika 23. shematski prikazuje strukturu proteina ApoA5. N-terminalna domena ApoA5 sadrži 146 aminokiselina i sastoji se od nakupine (svežnja) amfipatskih  $\alpha$ -uzvojnica (*engl.*  $\alpha$ -*helix bundle*).<sup>192</sup>



Slika 23. Domene proteina ApoA5 (prilagođeno prema <sup>171</sup>)

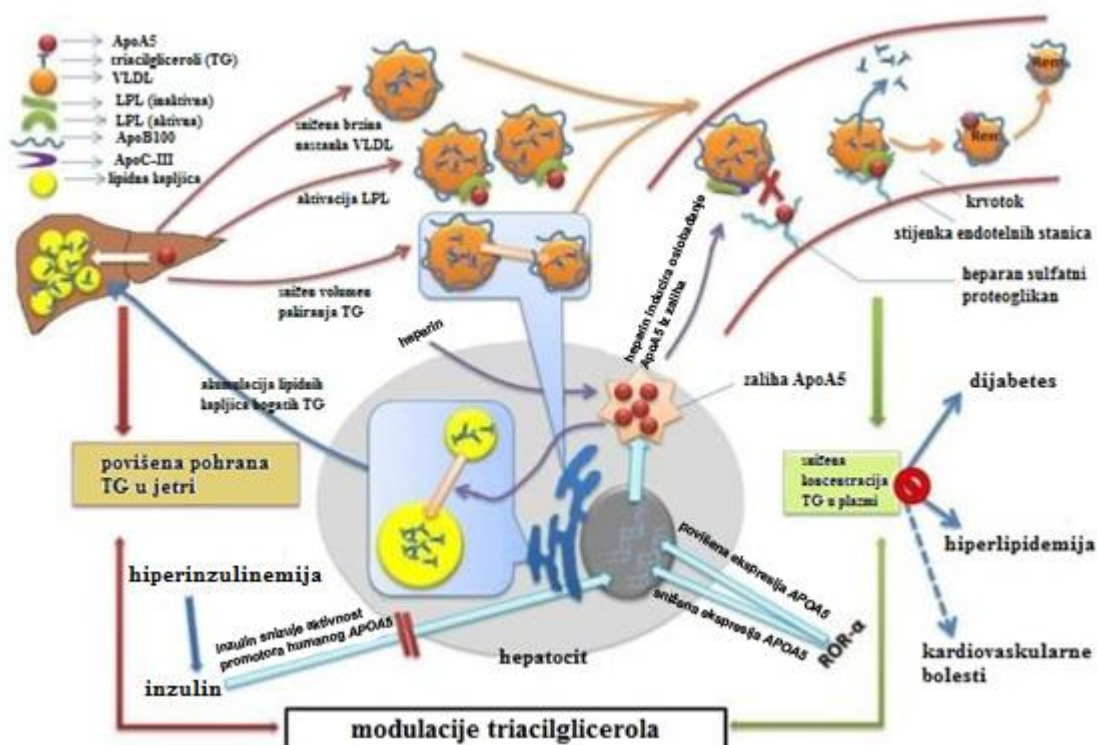
Ostaci iza aminoterminalne (NT) domene vjerojatno su potrebni za njegovu modulaciju aktivnosti triacilglicerola.<sup>193</sup> Pored NT domene smještena je centralna domena od 144 aminokiselinskih ostataka koja sadržava slijed bogat pozitivno nabijenim aminokiselinama.<sup>194</sup> Do tetraprolinskog motiva, tj. položaja 292, aminokiselinski slijed u centralnoj domeni ApoA5 nalikuje aminokiselinskom slijedu smještenom u N-terminalnoj domeni iza nakupine (svežnja)  $\alpha$ -uzvojnica. Predviđeno je da ta regija sadržava tri amfipatske  $\alpha$ -uzvojnice s visokim potencijalom za površinsku aktivnost. Nadalje, analizom varijabilnosti aminokiselinskog slijeda otkriveno je da je ta regija u proteinu najočuvanija među različitim vrstama sisavaca.<sup>164</sup> Ključna značajka centralne domene je aminokiselinski slijed između položaja 186 i 227. Taj segment od 42 aminokiseline sadržava osam pozitivno nabijenih aminokiselina i niti jednu negativno nabijenu aminokiselinu. S obzirom na činjenicu da su pozitivno nabijene aminokiseline u apolipoproteinima često umiješane u vezanje za receptore na površini stanice i/ili heparan sulfatne proteoglikane, istraživanja su provedena i s ApoA5. Kada je u zamjenu za heparan sulfatne proteoglikane korišten heparin, opaženo je vezanje ovisno o ionskoj jakosti.<sup>194</sup> Taj segment ApoA5 vjerojatno postoji kao nezavisno smotana strukturna domena koja sadržava aminokiselinske ostatke koji su ključni za vezne interakcije koje utječu na metabolizam lipoproteina u plazmi. Četiri uzastopna prolina blizu C-terminalnog kraja ApoA5 (aminokiselinski ostaci 293-296) razgraničavaju spoj između labavo smotanog C-terminalnog segmenta i centralne domene. Peptid koji odgovara ovom slijedu (aminokiselinski ostaci 296-343) istraživao je nuklearnom magnetnom rezonantnom spektroskopijom čime se otkrila produžena amfipatska  $\alpha$ -uzvojnica s ulogom u lipoproteinskom vezanju, kao komponenta cjelovitog ApoA5.<sup>195</sup> Podatci podupiru concept da C-terminalni segment nezavisno djeluje u moduliranju svojstava lipidnog vezanja ApoA5. Uloga C-terminalne regije ApoA5 u vezanju lipida potvrđena je i fluorescencijskom spektroskopijom u istraživanju autora Beckstead i sur.<sup>191</sup>

Istraživanja s raspršenom svjetlosti indiciraju da ApoA5 transformira vezikule dimiristolfosfatidilkolina u komplekse diskoidnog oblika s učinkovitošću sličnom onoj koju pokazuje apo A-I. Tehnike površinske kemije otkrile su da ApoA5 pokazuje visoku afinitet, nisku elastičnost i sporu kinetiku vezanja na hidrofobnim granicama faza. Takva svojstva mogla bi usporiti sklapanje čestica bogatih triacilglicerolima. Imunofluorescencijska istraživanja na COS-1 stanicama transfektiranim genom za humani ApoA5 pokazala su da se ApoA5 slabo luči, ostaje povezan s endoplazmatskim retikulom i ne transportira se u Golgi. Budući da prekomjerna ekspresija gena *APOA5* snižava koncentraciju triacilglicerola u plazmi u miševa, ova istraživanja ukazuju na unutarstaničnu ulogu apoA5 u modulaciji sinteze i/ili sekrecije hepatičkog VLDL.<sup>164</sup>

#### 2.2.1.4. MEHANIZAM DJELOVANJA APOLIPOPROTEINA A5

Od otkrića ApoA5 nastoji se rasvijetliti molekularni mehanizam kojim ApoA5 regulira koncentraciju triacilglicerola u plazmi. Iako još uvijek postoje debate oko mehanizma djelovanja ApoA5, prednjače dvije teorije koje opisuju kako ApoA5 modulira triacilglicerole: ApoA5 ubrzava katabolizam triacilglicerola lipoprotein-lipazom u lipoproteinima bogatim triacilglicerolima i uklanjanje ostalih lipoproteina iz krvotoka ili inhibira brzinu nastanka VLDL-a (Slika 24).





Slika 24. Uloga ApoA5 u modulaciji koncentracije triacilglicerola (prilagođeno prema <sup>166</sup>)

Lipoliza je ključan korak u uklanjanju lipoproteina bogatih triacilglicerolima i odvija se prvenstveno na luminalnoj strani kapilara skeletnih mišića i adipoznog tkiva. Lipoprotein-lipaza (LPL) sintetizirana u mišićima i adipocitima translocira se do kapilara endotelnih stanica. Brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja identificirala su ApoA5 kao snažan stimulator aktivnosti lipoprotein-lipaze.<sup>196, 197, 198</sup>

U prilog prvoj teoriji idu rezultati istraživanja Merkel i sur. u kojima se ističe da je redukcija triacilglicerola rezultat hidrolize VLDL i/ili hilomikrona lipoprotein-lipazom posredovanom ApoA5. U svom istraživanju otkrili su da ApoA5 nema utjecaja na brzinu hidrolize lipoprotein-lipazom u odsustvu proteoglikana, te da povišena aktivnost lipoprotein-lipaze „popravlja“ hipertrigliceridemiju kod ApoA5 deficijernih miševa do normalnih vrijednosti koncentracija triacilglicerola. Međutim, prekomjerna ekspresija ApoA5 u manjoj je mjeri imala modulacijski učinak na koncentracije triacilglicerola kada je reducirana lipoprotein-lipaza.<sup>197</sup> Drugim riječima, ApoA5 ubrzava hidrolizu lipoproteina bogatih triacilglicerolima u plazmi tako što olakšava interakciju lipoproteina s heparan sulfatnim proteoglikanom (HSPG, *engl. heparan sulfate proteoglycan*) za koji se veže lipoprotein-lipaza, ali ne i za samu, slobodnu lipoprotein-lipazu. Weinberg i sur. dokazali su da je veća vjerojatnost da ApoA5

mijenja koncentraciju triacilglicerola tako što mijenja brzinu nastanka i sekrecije VLDL čestice, nego ubrzanjem aktivnosti lipoprotein-lipaze koja hidrolizira lipoproteine koji su bogati triacilglicerolima.<sup>164</sup> U istom se istraživanju navodi da ApoA5 na hidrofobnim kontaktnim površinama pokazuje viši afinitet, nižu elastičnost i sporiju kinetiku vezanja za međusloj fosfolipid/voda (KSV 5000 Langmuir film). Ta svojstva podržavaju pretpostavku da bi ApoA5 mogao usporiti produkciju VLDL čestica. Humane COS-1 stanice transfektirane s genom za ApoA5 pokazivale su slabu sekreciju proteina ApoA5 iz endoplazmatskog retikula (ER) kao i smanjeno prometovanje prema Golgijevom aparatu, možda radi interferencije sekrecijskih puteva iz ER/Golgijevog aparata i prekomjerne ekspresije ApoA5 proteina.<sup>199</sup>

Inzulin regulira ekspresiju ApoA5 inhibiranjem aktivnosti *APOA5* promotora, što bi moglo objasniti povezanost hiperinzulinemije i hipertrigliceridemije.<sup>185</sup> ApoA5 ima visok afinitet za heparin i heparin sulfatne proteoglikane radi svojih pozitivno nabijenih ostataka što poboljšava vezanje i hidrolizu lipoproteina.<sup>200</sup> Injekcije heparina rezultiraju naglim porastom koncentracije ApoA5 u plazmi. Heparin bi potencijalno mogao imati ulogu posrednika u hidrolizi lipoproteina bogatim triacilglicerolima povezanih s ApoA5. Heparin značajno snižava vezanje ApoA5 za protein povezan s lipoproteinskim receptorom (LRP, *engl. lipoprotein receptor-related protein*) i SorLA (*engl. A repeats-containing*), članove obitelji receptora za lipoproteine niske gustoće (LDLR, *engl. Low-density lipoprotein receptor*) a koji su involvirani u hidrolizu hilomikrona povezanih s ApoA5.<sup>200</sup>

Uz ulogu u metabolizmu triacilglicerola, ApoA5 je prepoznat kao protein akutne faze – koncentracija ApoA5 porasla je kada je miševima bio injektiran endotoksin, međutim, ekspresija ApoA5 pri tome ne zavisi o koncentraciji triacilglicerola u plazmi u miševa,<sup>201, 202</sup> što ističe paradoksalno „ponašanje“ ApoA5.

#### 2.2.1.5. APOLIPOPROTEIN A5 U KARDIOMETABOLIČKIM BOLESTIMA

U različitim dijelovima svijeta (Europa, Brazil, SAD, Kina, Japan) provode se istraživanja povezanosti genetske varijabilnosti - polimorfizama jednog nukleotida (SNP) na lokusu *ApoA5* s rizikom nastanka kardiometaboličkih bolesti. Neki od SNP-ova pozitivno su povezani s kardiometaboličkim bolestima – koronarnom bolesti srca, metaboličkim sindromom i cerebrovaskularnim poremećajima u tim populacijama.

### 2.2.1.5.1. KARDIOVASKULARNE BOLESTI

SNP-ovi u *ApoA5* povećavaju rizik za hipertrigliceridemiju. Veća učestalost T/C SNP (*c.553 G>T*) u 5'-regiji *APOA5* gena u korelaciji je s povišenom koncentracijom triacilglicerola u odraslih osoba i djece u Japanu koje su participirale u istraživanju (481 osoba muškog spola, 412 osoba ženskog spola, 552 djece) u usporedbi s populacijom bijelaca.<sup>203, 204</sup> Srodna povezanost uočena je za polimorfizam *SNP3 (-1131 T>C)*, visoku koncentraciju triacilglicerola i nisku koncentraciju HDL u skupini pacijenata koji su sudjelovali u studijama u Hong Kongu i Guangzhou,<sup>205</sup> te preventivskom programu regije Augsburg u Njemačkoj (KORA n= 1354) i SAPHIR u Salzburgu (n=1770).<sup>206</sup> Studija istraživanja parova i meta-analiza provedene u Kini, Zhejiang, potvrdile su značajnu povezanost između polimorfizma *SNP3 (-1131 T>C)* i koronarne bolesti srca.<sup>207</sup>

Povezanost genskih varijanti u genu *APOA5* i koronarne bolesti arterija (CAD, *engl. coronary artery disease*) ostaje kontroverzna. U pacijenata s akutnim koronarnim sindromom (ACS, *engl. acute coronary syndrome*) visoke koncentracije ApoA5 u plazmi povezane su s povećanom prisutnošću ACS, povišenim vrijednostima C-reaktivnog proteina i visokom koncentracijom triacilglicerola, uz normalne vrijednosti kolesterola u plazmi. U istraživanju koje je uključivalo pacijente muškog spola s koronarnom bolesti arterija u Koreji, uočeno je sniženje koncentracije ApoA5 u plazmi oboljelih. Niže koncentracije ApoA5 u uzajamnoj su vezi s povišenim koncentracijama triacilglicerola i inzulina, te sniženom koncentracijom HDL, čime se povećava rizik za nastanak koronarne bolesti arterija.<sup>208</sup> U kineskoj populaciji na Tajvanu, *-1131C* homozigotni alel i *c.553.T* heterozigotni alel povezani su koronarnom bolesti arterija,<sup>209</sup> ali u istraživanju provedenom u Vancouveru, polimorfizam *SNP3 (-1131T>C)* nije bio povezan s ovom bolesti.<sup>210</sup> U istraživanju provedenom u Italiji utvrđena je povezanost *ApoA5 -1131C* alela s povišenom koncentracijom triacilglicerola, ali ne i s koronarnom bolesti arterija.<sup>211</sup>

Dokazana je povezanost polimorfizama jednog nukleotida s težom koronarnom aterosklerozom. U istraživanju provedenom u Italiji na pacijentima s ranim infarktom miokarda utvrđena je jaka povezanost između *ApoA5 -1131C* alela, povišene koncentracije triacilglicerola i rizika za rani infarkt miokarda.<sup>212</sup> Kod učesnika Framinghamove studije s polimorfizmom *S19W (56C>G)*, kojima je izvršen ultrazvučni pregled karotide, otkrivena je povećana ateroskleroza (zadebljanje intimalnog i medijalnog dijela stijenke karotidne arterije;

IMT *engl. intimal medial thickness* – marker ateroskleroze) u usporedbi s nositeljima divljeg tipa, a polimorfizam *SNP3 (-1131 T>C)* povezan je s povišenim IMT jedino u pretilih osoba, čak i nakon regulacije koncentracije triacilglicerola medikamentima.<sup>178</sup> U LCAS (*The Lipoprotein and Coronary Atherosclerosis*) studiji polimorfizam *S19W (56 C>G)* u korelaciji je s minimalnim dijametrom lumena koronarnih ateroskleroznih lezija i srednjom vrijednosti broja okluzija koronarnih arterija.<sup>213</sup> Koncentracija ostatnih lipoproteina koji se nakupljaju tijekom parcijalne hidrolize lipoproteina bogatih triacilglicerolima je povišena za vrijeme ateroskleroze. Polimorfizmi gena *APOA5* nemaju utjecaja na koncentraciju tih ostatnih lipoproteina.<sup>214</sup> Polimorfizmi jednog nukleotida za gen *APOA5* povezani su i s drugim kardiovaskularnim bolestima. *APOA5* je kao meta uzvodnog stimulatornog faktora-1 (*USF-1; engl. upstream stimulatory factor-1*) pokazao povišen rizik za ateroskrozu u obiteljima s varijantama polimorfizama *ApoA5 S19W (56 C>G)* i *rs2516839 USF1*.<sup>215</sup> *USF1* nadzire ekspresiju nekoliko gena umiješanih u homeostazu lipida i glukoze, i suograničava gene povezane s obiteljskom kombiniranom hiperlipidemijom (*FCHL, engl. familial combined hyperlipidemia*) i dijabetesom tipa 2 na kromosomu 11q22-23. Povezanost polimorfizama – *SNP3 (-1131 T>C)* i kozak (*-3 A>G*) *ApoA5* s obiteljskom kombiniranom hiperlipidemijom dokazana je u kineskoj populaciji u Hong Kongu.<sup>216</sup> *SNP S19W (56 C>G)* prevladavao je kod hipertrigliceridemičnih pacijenata s pankreatitisom, u usporedbi s pacijentima samo s ozbiljnom hipertrigliceridemijom.<sup>217</sup> Polimorfizam *SNP3 (-1131 T>C)* povećava rizik za cerebrovaskularnu ateroskrozu u pacijenata s hiperlipoproteinemijom tipa III.<sup>218</sup>

#### 2.2.1.5.2. POVEZANOST SNP-ova ZA ApoA5 S METABOLIČKIM SINDROMOM

Pretilost predisponira razvitak cijele skupine nepravilnosti u pojedinaca, koja obuhvaća dislipidemiju (hipertrigliceridemiju i sniženu koncentraciju HDL-kolesterola), hipertenziju i intoleranciju glukoze. Konzistentna povezanost opažena između lokusa *ApoA5* i pretilosti dovela je do istraživanja mogućeg učinka na metabolički sindrom.

Do danas, većina istraživanja o fiziološkom utjecaju polimorfizama gena *APOA5* usmjerena je na polimorfizam *SNP3 (-1131 T>C)* i provedena je u različitim populacijama. Korištenjem dizajna istraživanja parova (*engl. case-control design*) Maász et al. dokazali su da je prisustvo *-1131C* alela približno dvostruko veće kod pacijenata s metaboličkim sindromom u odnosu na kontrolnu skupinu.<sup>219</sup> Obzirom na istovjetno genetičko porijeklo ispitanika, tu su

povezanost u mađarskoj populaciji detaljnije istražili Kisfali i suradnici.<sup>220</sup> Određena su četiri polimorfizma (*SNP3* (-1131 T>C), *IVS3* + 476 G>A, *SNP1* (c.1259 T>C) i *S19W* (c.56 C>G)), a analizom haplotipova utvrđeno je da *APOA5*\*2 značajno pridonosi razvoju metaboličkog sindroma. Budući da se stopa prevalencije za *APOA5*\*4 haplotip nije razlikovala za pacijente s metaboličkim sindromom i kontrolnu skupinu ispitanika, ovaj haplotip ne pridonosi riziku za nastanak bolesti. Sveobuhvatnije studije proveli su Ong i suradnici u Hong Kongu (1330 ispitanika) i Guangzhou (1952 ispitanika) u kojima su analizirali pet polimorfizama u promotorskoj regiji *APOA5*.<sup>221</sup> Njihovi su rezultati pokazali da je rijetki C alel u -1131 T>C povezan s približno 50 % većim rizikom za metabolički sindrom u obje kineske kohorte, te da je *SNP3* (-1131 T>C) SNP u značajnoj mjeri povezan s brojnim komponentama metaboličkog sindroma. Povezanost *APOA5 SNP3* (-1131 T>C) varijante s predispozicijom za komplikacije metaboličkog sindroma potvrđena je i u marokanskoj populaciji.<sup>222</sup>

Dakle, značajna povezanost metaboličkog sindroma sa *SNP3* (-1131 T>C) varijantom otkrivena je u mađarskoj, rumunjskoj, japanskoj, marokanskoj i kineskoj populaciji, ali ne i u njemačkoj, austrijskoj i turskoj populaciji.<sup>170</sup> U istom se radu navode etničke razlike u frekvenciji rijetkog alela, koje variraju od 35,3% u japanskoj i 28,3% u kineskoj populaciji, do 12,8% u turskoj populaciji te 7 do 8% u bijelaca, što sugerira etničko-specifični utjecaj genetičkih varijanti u *APOA5* na rizik od metaboličkog sindroma.

Povezanost metaboličkog sindroma s ovim genskim lokusom istraživana je i u studijama s drugim polimorfizmima. Metabolički sindrom povezan je s polimorfizmom *S19W* (c.56 C>G) u marokanskoj populaciji.<sup>222</sup> Dvije relativno velike studije provedene su na 10 polimorfizama gena *APOA5*, u južnoj Njemačkoj na 1354 ispitanika (KORA) i u Austriji (SAPHIR) na 1770 ispitanika.<sup>206</sup> Otkrivena je povezanost rijetkog G alela u polimorfizmu *S19W* (c.56 C>G) s približno 50% većim rizikom za metabolički sindrom u obje studije. Rezultati su potvrđeni studijom provedenom u Francuskoj<sup>223</sup> u kojoj se navodi povišena osjetljivost na metabolički sindrom kod ispitanika s varijantom *S19W* (c.56 C>G). Kod velikog istraživanja provedenog u Japanu na 44 polimorfizma jednog nukleotida kod 2417 ispitanika (1522 s metaboličkim sindromom i 895 kontrola<sup>224</sup> dva su polimorfizma gena *APOA5* (kozak (-3 A>G) i 553 G>T) povezana s prevalencijom metaboličkog sindroma i predstavljaju rizični faktor. Rizične faktore predstavljaju i varijante alela *SNP4* (-12238 T>C) i *IVS3* + 476 G>A.<sup>225, 226</sup>

U pretilih osoba s većim indeksom tjelesne mase (BMI, *engl. body mass indeks*) i visokom koncentracijom triacilglicerola, viša frekvencija *-1131C* alela utvrđena je samo u pacijenata s metaboličkim sindromom, ali ne i u pacijenata s kardiovaskularnim bolestima.<sup>227</sup>

### 2.3. PROTEINI-NOSAČI LIPIDA

Proteini-nosači lipida (LBP, *engl. lipid binding proteins*) čine veliku obitelj malih (14–15 kDa), unutarstaničnih proteina koji vežu lipide<sup>228</sup> a imaju ulogu u signalizaciji, regulaciji, transportu kroz membrane, imunološkom odgovoru, metabolizmu lipida i transportu.<sup>229</sup> Vežanje lipida je reverzibilno i nekovalentno, a proteini nosači lipida (zvani još i lipidni šaperoni) značajno poboljšavaju topljivost lipida i olakšavaju njihov transport između tkiva i unutar stanica tkiva. I transport lipida kroz biološke membrane također olakšavaju specifični proteini nosači lipida, koji su vezani za membranu. Zajedno, oni određuju biodostupnost njihovih liganada, a time i znatno utječu na daljnju obradu, korištenje ili signalni učinak lipida. Biodostupnost određenih vrsta lipida tako je regulirana prisutnošću specifičnih proteina koji vežu lipide, afinitetom tih proteina za različite vrste lipida, te prisutnošću konkurentnih liganada (uključujući farmaceutske spojeve). Novija istraživanja ukazuju da bi posttranslacijske modifikacije proteina-nosača lipida mogle imati veliki učinak na interakcije između lipida i proteina.<sup>230</sup> Proteini-nosači lipida razlikuju se u slijedu aminokiselina, strukturi i ulozi.<sup>231</sup>

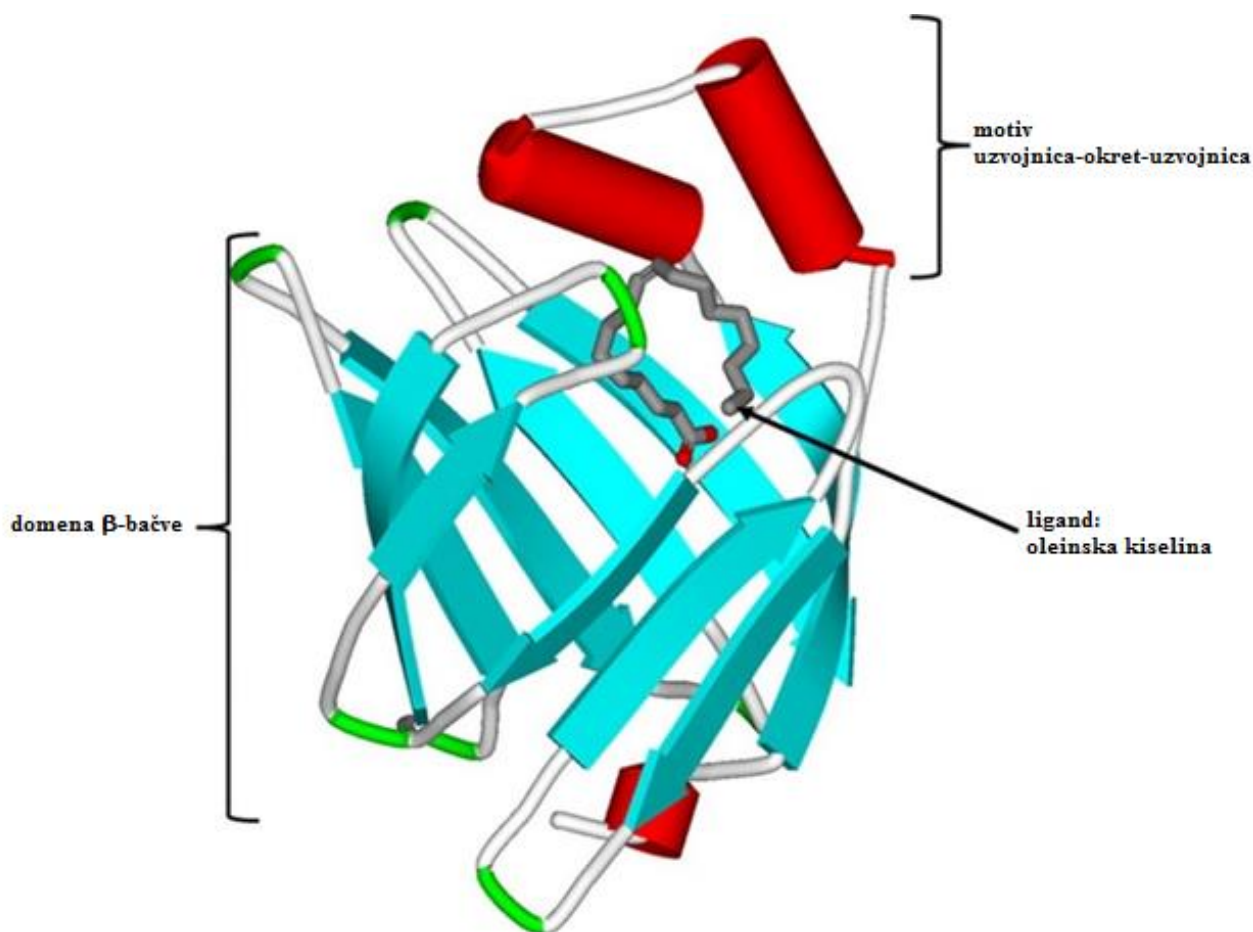
Obitelj proteina-nosača lipida podjeljena je u četiri podobitelji na temelju vrsta liganada koje vežu.<sup>232</sup> Prva od njih veže derivate vitamina A i sadrži proteine koji vežu retinoičnu kiselinu (CRABPs, *engl. cellular retinoic acid-binding proteins*) i proteine koji vežu retinol (CRBPs, *engl. cellular retinol-binding proteins*). Druga podobitelj uključuje FABP1 i FABP6, te veže veće hidrofobne spojeve, kao što su žučne kiseline, hem i acil-CoA. Treća podobitelj uključuje FABP2, koji veže isključivo dugolančane masne kiseline. Četvrta, najveća podobitelj, uključuje FABP3, FABP4, FABP5, FABP7, FABP8 i FABP9, koji vežu niz liganada, kao što su dugolančane masne kiseline, eikosanoidi i retinoidi.<sup>233</sup>

Proteini nosači lipida dio su veće superobitelji proteina koji vežu lipofilne ligande i koji su vrlo izraženi u cijelom životinjskom carstvu, a zovu se kalcini.<sup>234</sup> Unutar životinjskog carstva, proteini nosači lipida pronađeni su i u kralježnjaka i u beskralježnjaka.<sup>235</sup> Istraživanja temeljena na homologiji između nasljeđenih LBP gena i sekvenci LBP pokazala su odsutnost ove obitelji u genomima kvasaca (*Saccharomyces cerevisiae*) i biljaka (*Arabidopsis thaliana*),

ograničavajući ih na životinjsko carstvo. Posljedično, zaključeno je da su se geni u životinja za LBP proteine odvojili od gena u biljaka i gljiva prije 930 milijuna godina.<sup>235</sup>

### 2.3.1. *PROTEINI-NOSAČI MASNIH KISELINA*

Proteini-nosači masnih kiselina (FABP, *engl. fatty acid binding proteins*) članovi su obitelji proteina-nosača lipida (LBP) i uključeni su u reverzibilno vezanje unutarstaničnih hidrofobnih liganada, njihovo prometovanje širom staničnih odjeljaka, uključujući peroksisome, mitohondrije, endoplazmatski retikul i jezgru. Proteini-nosači masnih kiselina su mali, strukturno očuvani citosolni proteini koji se sastoje od vodom ispunjenog džepa u kojem se odvija vezanje, okruženog s deset antiparalelnih  $\beta$ -nabranih ploča (po pet ploča ortogonalno položenih čine strukturu) ( $\beta$ A- $\beta$ J), koje formiraju takozvanu  $\beta$  bačvu, koja je blago eliptičnog oblika.<sup>228, 236, 237</sup> Na površini, pri vrhu, dvije  $\alpha$ -uzvojnice čine kapu („poklopac“) kojom prekrivaju otapalu dostupan džep i smatra se da reguliraju vezivanje ( $\alpha$ I- $\alpha$ II) (Slika 25.).



Slika 25. Vrpčasti prikaz humanog H-FABP s oleinskom kiselinom kao ligandom.

Struktura proteina je slična u svih FABP i prikazuje domenu  $\beta$ -bačve i N-terminalni motiv uzvojnica-okret-uzvojnica. (prilagođeno prema <sup>238</sup>)

N-terminalni kraj s uzvojnica je umiješan u regulaciju prijenosa masnih kiselina kroz membrane putem elektrostatskih interakcija.<sup>239</sup> Proteini-nosači masnih kiselina imaju široku specifičnost koja uključuje njihovu sposobnost da vežu dugolančane (C12-C20) masne kiseline, eikosanoide, žučne soli i proliferatore peroksisoma.

Razlikuju se u selektivnosti, afinitetu vezanja i mehanizmima vezanja.<sup>239</sup> Općenito, ovi lipidni šaperoni vežu samo jedan ligand po molekuli proteina, uz iznimku L-FABP, koji je sposoban vezati dva liganda istovremeno. Prema tzv. „portalnoj hipotezi“ koju podupire više istraživačkih timova, pretpostavlja se da pri vezanju liganda, masna kiselina ulazi u područje proteina dostupno otapalu, kroz dinamičnu regiju koju čine  $\alpha$ -uzvojnica II i okreti između  $\beta$ C- $\beta$ D i  $\beta$ E- $\beta$ F petlje, prije vezivanja u šupljini proteina.<sup>240</sup> Afiniteti prema ligandima općenito se povećavaju s porastom hidrofobnosti molekula, a smanjuju sa smanjenjem duljine lanca u



molekulama i povećanjem nezasićenosti. Specifičnost prema ligandu i afinitet određuju pobočni lanci aminokiselina koji se pružaju u unutrašnjost šupljine, naročito polarni ostaci koji interakcije ostvaruju vodikovim vezama i elektrostatskim interakcijama s polarnim grupama liganda.

Konstante disocijacija izračunate su u rasponu od nanomolarnih do mikromolarnih vrijednosti.<sup>237, 241, 242</sup> Rendgenskom kristalografijom i nuklearnom magnetskom rezonancijom otkrivene su karakteristike vezanja masnih kiselina unutar vodom ispunjene šupljine. Vezane masne kiseline zauzimaju približno 1/3 ukupnog volumena džepa.<sup>243</sup> U pravilu, orijentirane su tako da je karboksilna skupina okrenuta prema unutra. U ovakvom vezanju karboksilnih skupina masnih kiselina, obično su uključeni tirozinski i argininski bočni ogranci.<sup>243</sup> Konformacije vezanja za određeni FABP malo se razlikuju za različite masne kiseline, što dodatno pridonosi razlikama između pojedinih članova obitelji FABP.

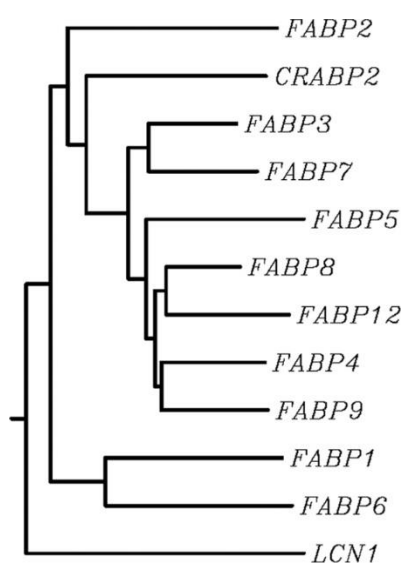
FABP pokazuju snažnu evolucijsku očuvanost i prisutni su u širokom spektru vrsta, uključujući vrste *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, miševe i ljude.<sup>233</sup>

U sisavaca je izolirano devet različitih proteina-nosača masnih kiselina (FABP, *engl. fatty acid binding proteins*) a svi su imenovani prema tkivu/organu iz kojeg su izolirani ili po tkivu u kojem dominiraju (Tablica 3). Ekspresijski profili nisu isključivi za taj određeni organ.

Tablica 3. Nazivi proteina-nosača masnih kiselina, tkivo/organ iz kojeg su izolirani i nazivi njihovih gena

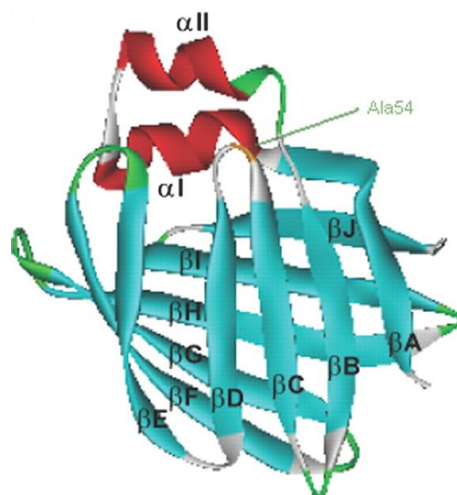
IME PROTEINA	TKIVO/ORGAN	GEN
<b>L-FABP ili FABP1</b>	jetreni	<i>Fabp-1</i>
<b>I-FABP ili FABP2</b>	intestinalni	<i>Fabp-2</i>
<b>H-FABP ili FABP3</b>	srčani i mišićni	<i>Fabp-3</i>
<b>A-FABP ili FABP4</b>	adipocitni	<i>Fabp-4</i>
<b>E-FABP, KFABP ili FABP5</b>	epidermalni	<i>Fabp-5</i>
<b>IL-FABP</b>	ilealni	<i>Fabp-6</i>
<b>B-FABP</b>	moždani	<i>Fabp-7</i>
<b>M-FABP ili FABP8</b>	mijelinski	<i>Fabp-8</i>
<b>T-FABP</b>	testisni	<i>Fabp-9</i>

Iako članovi FABP obitelji dijele umjerenu homologiju aminokiselinskog slijeda od 20 do 70%, njihove tercijarne strukture gotovo se preklapaju.<sup>238</sup> Filogeneza humanih FABP prikazana je kao dendrogram na slici 26 i pokazuje divergenciju primarnih sekvenci tijekom vremena.

Slika 26. Filogeneza humanih FABP (prilagođeno prema <sup>233</sup>)

### 2.3.1.1. PROTEIN-NOSAČ MASNIH KISELINA 2 (FABP2)

Protein-nosač masnih kiselina 2 (FABP2), intestinalni FABP ili I-FABP (Slika 27) odgovoran je za prijenos slobodnih masnih kiselina u stanice intestinalnog endotela (Slika 28), a kodiran je genom *FABP2*.

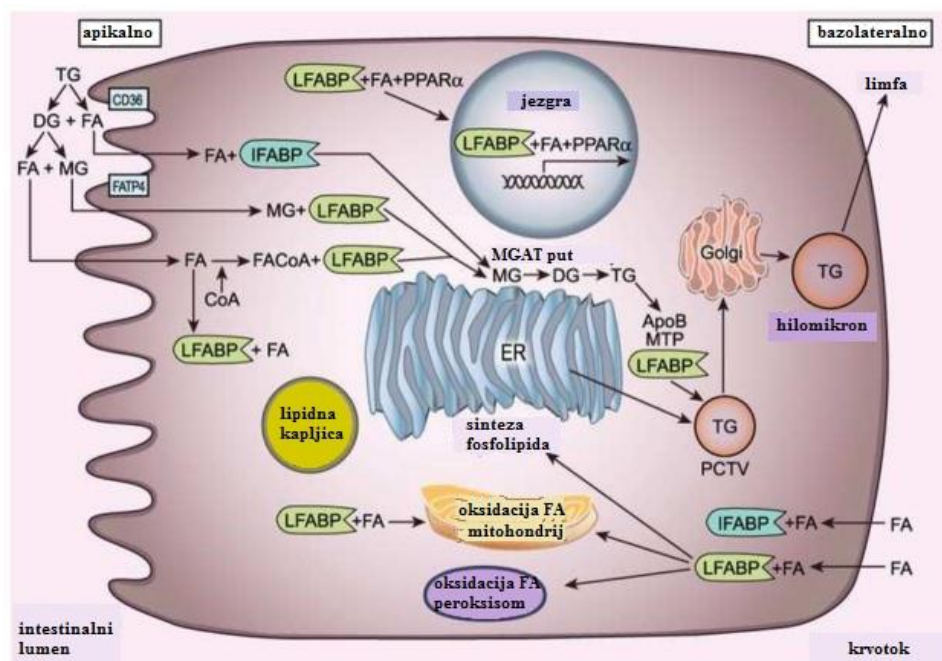


Slika 27. Vrpčasti prikaz protein-nosača masnih kiselina 2.

Struktura je izvedena iz rezultata istraživanja dobivenih nuklearnom magnetnom rezonancijom, a generirana s Accelrys DS Visualizer ([www.accelrys.com](http://www.accelrys.com)). (prilagođeno prema <sup>237</sup>)

Intestinalna izoforma FABP posreduje u apsorpciji masti putem vezanja i unutarstaničnog prometovanja slobodnih dugolančanih masnih kiselina. Ekspimiran je u velikoj mjeri u cijelom crijevnom traktu, s najvišim koncentracijama u distalnom dijelu organa. Budući da se uz intestinalni FABP u intestinalnom traktu ekspimiraju i jetreni L-FABP, teško je odrediti pojedinačni doprinos svakog proteina u vezanju, prometovanju i metabolizmu masnih kiselina.<sup>241, 244</sup> Intestinalni FABP aktivno participira u metabolizmu lipida unešenih hranom u organizam zbog njegove visoke specifičnosti i selektivnosti za dugolančane masne kiseline. Afinitet proteina prema ligandu ovisi o vrsti masne kiseline.<sup>245, 246</sup> Jetreni i intestinalni FABP vežu zasićene dugolančane masne kiseline s relativno istim afinitetom (ali u različitim stehiometrijskim omjerima). Intestinalni FABP pokazuje manji afinitet za nezasićene masne kiseline.<sup>247, 248</sup> Nadalje, šupljina vezanja u intestinalnom FABP mnogo je manja od one u jetrenom FABP. Vezane masne kiseline su u malo savijenoj konformaciji, s ugljikovodičnim repom koji se pruža prema  $\alpha$ -uzvojnica ( $\alpha_I$ - $\alpha_{II}$ ) i karboksilnom skupinom ukopanom u šupljini. Karboksilna skupina ulazi u interakcije s Arg106, Gln115 i dvije molekule vode.<sup>240</sup>

Većina aminokiselinskih ostataka ne prolazi konformacijske promjene između holo-oblika (kada je vezan ligand) i apo-oblika (kada nije vezan ligand) intestinalnog FABP.<sup>249</sup>



Slika 28. Uloga intestinalnog i jetrenog FABP u enterocitima intestinalnog trakta.

U lumenu crijeva, triacilgliceroli (TG, *engl. triacylglycerols*) unešeni hranom u organizam hidrolizirani su lipazama do diacilglicerola (DG, *engl. diacylglycerols*) i masnih kiselina (FA, *engl. fatty acids*). Diacilgliceroli bivaju hidrolizirani do monoacilglicerola (MG, *engl. monoacylglycerols*) i masnih kiselina. Masne kiseline i monoacilgliceroli se transportiraju kroz apikalnu membranu enterocita difuzijom, olakšanim transportom pomoću CD36 (skupine diferencijacije 36) ili drugih potencijalnih transportera kao što je protein za transport masnih kiselina (FATP, *engl. fatty acid transport protein*). U citosolu, I-FABP specifično veže masne kiseline, dok L-FABP veže masne kiseline, acil-CoA i monoacilglicerole. U endoplazmatskom retikulu (ER), ponovno se sintetiziraju triacilgliceroli iz masnih kiselina i monoacilglicerola. L-FABP je dio kompleksa zajedno s mikrosomalnim proteinom za transport triacilglicerola (MTP, *engl. microsomal triglyceride transport protein*), CD36 i apolipoproteinom B48 koji je odgovoran za pupanje prehilomikronske transportne vezikule (PCTV, *engl. prechylomicron transport vesicles*) s ER. PCTV tada stiže do Golgijevog aparata gdje nastaju zreli hilomikroni. Hilomikroni napuštaju enterocite na bazolateralnoj strani stanice i ulaze u limfni sustav, a potom u krvotok. L-FABP može transportirati masne kiseline do receptora za aktivator proliferacije peroksisoma  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) te promicati ekspresiju gena za oksidaze. Masne kiseline i monoacilgliceroli iz cirkulacije ulaze u enterocite putem bazolateralne membrane gdje se mogu vezati s I-FABP (masne kiseline) ili L-FABP (masne kiseline i monoacilgliceroli). Za razliku od lipida porijeklom iz hrane, masne kiseline i monoacilgliceroli iz krvotoka primarno se oksidiraju ili ugrađuju u fosfolipide sluznice. (prilagođeno prema <sup>250</sup>)

Aminokiselinski ostaci Val26 do Asp35, Ser52 do Arg56 i Ala73 do Thr76 ( $\alpha$ II i  $\beta$ C- $\beta$ D te  $\beta$ E- $\beta$ F okreti) prolaze značajne promjene konformacije nakon vezanja liganda, formirajući kapu („poklopac“) preko masne kiseline.

Intestinalni FABP ima dva oblika. Jedan sadržava alanin na položaju 54, a drugi treonin. Između njih postoje razlike u vezanju i transportu masnih kiselina u stanicama.<sup>251</sup> Protein koji sadržava treonin ima veću sposobnost vezanja i transportiranja dugolančanih masnih kiselina kroz stanice od proteina s alaninom.<sup>252</sup> Protein koji sadržava treonin povezan je s povišenim koncentracijama triacilglicerola u plazmi,<sup>253</sup> inzulinskom rezistencijom i koncentracijom inzulina natašte.<sup>252</sup>

### 2.3.2. STRUKTURA GENA FABP2

Geni koji kodiraju za proteine-nosače masnih kiselina raspršeni su u genomu, a njihova je struktura dobro očuvana.<sup>239</sup> Humani gen *FABP2* lociran je na kromosomu 4 (4q28-q31)<sup>254</sup> i sadržava 3382 nukleotida. Sastoji se od četiri egzona (od približno 700 bp) i tri introna (od približno 2650 bp) varijabilnih duljina. Promotorska regija ima dva transkripcijska inicijacijska mjesta i odgovarajuće TATA-sljedove (TATA- „kutije“).<sup>245, 255</sup>

### 2.3.3. POLIMORFIZMI FABP2 I METABOLIČKI SINDROM

Provedena su opsežna istraživanja na varijantama gena *FABP2* kako bi se bolje razumio njihov eventualni doprinos metaboličkim bolestima. Identificirano je nekoliko polimorfizama jednog nukleotida (SNP) u genu *FABP2*, ali samo je jedan od njih povezan s patofiziologijom koja se pripisuje metaboličkom sindromu.<sup>245, 252, 256, 257</sup> Varijante gena uključuju sedam alela u mikrosatelitnoj regiji introna 2.<sup>258</sup>

Pronađena su tri SNP-a – dva su tihe varijante koje se javljaju u kodirajućoj regiji gena ( $T \rightarrow C$  na kodonu 71 i  $A \rightarrow G$  na kodonu 118),<sup>252</sup> a treći je lociran na kodonu 54 ( $G \rightarrow A$ , tj. supstitucija aminokiselina Ala  $\rightarrow$  Thr) i povezan je s dislipidemijom, inzulinskom rezistencijom i pretilosti.<sup>252, 256, 257</sup> Pronađene su frekvencije za alanin-kodirajuće (Ala54) i treonin-kodirajuće (Thr54) *FABP-2* alele od 0,71 i 0,29 u populaciji 760 Pima indijanaca (u kojih je najveća prevalencija šećerne bolesti tipa 2).<sup>252</sup> Slične frekvencije (0,69 i 0,31) određene su u istraživanju u uzorcima DNA 56 bijelaca, u kojem su Thr54 homozigoti imali višu srednju

vrijednost koncentracije dvosatnog inzulina u plazmi tijekom oralnog testa na toleranciju glukoze u odnosu na Ala54 homozigote.<sup>252</sup> Na osnovu tih istraživanja zaključeno je da *FABP-2* nije najznačajniji “gen dijabetesa”, međutim, mogao bi biti povezan sa sklonosti za šećernu bolest tipa 2. Srodna studija s *Ala54Thr* SNP i parametrima pretilosti i rizičnim čimbenicima za kardiovaskularne bolesti provedena je u Španjolskoj na 264 pretilo osobe.<sup>259</sup> Frekvencije alela za *Ala54/Thr54* heterozigote i *Thr54/Thr54* homozigote bile su 34,8% i 7,2%, a značajno su povezane s povišenom koncentracijom C-reaktivnog proteina. *Ala54Thr* polimorfizam često se nalazi u približno 30% populacija i povezan je s inzulinskom rezistencijom,<sup>260</sup> dislipidemijom i pretilosti.<sup>261, 262</sup> Različite meta analize evaluirale su utjecaj *Ala54Thr* polimorfizma na indeks tjelesne mase,<sup>263</sup> inzulinsku rezistenciju<sup>264</sup> i koncentraciju lipida natašte<sup>261</sup> u populacijama širom svijeta. U prvom istraživanju nije pronađena veza između polimorfizma *Ala54Thr* i indeksa tjelesne mase.<sup>263</sup> Slaba povezanost utvrđena je između ovog polimorfizma i inzulinske rezistencije.<sup>264</sup> Snažna povezanost postoji između *Thr54* alela i povišenih koncentracija triacilglicerola i LDL-kolesterola, te sniženih koncentracija HDL-kolesterola.<sup>261</sup> Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se u potpunosti razjasnilo da li polimorfizmi *FABP2* značajno pridonose sastavnicama metaboličkih poremećaja.



## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

Dizajn istraživanja:

Provedeno presječno i komparativno istraživanje dio je velikog epidemiološkog istraživanja kroničnih bolesti u hrvatskoj populaciji u različitim dijelovima Republike Hrvatske. Istraživanje je započelo 1969. godine kada je određena kohorta, a proveli su ga znanstvenici i liječnički tim Instituta za medicinska istraživanja u Zagrebu sa suradnicima iz drugih ustanova. Naši rezultati su rezultati trećeg praćenja ovog obimnog istraživanja. Cijelo istraživanje je detaljno opisano u literaturi.<sup>30, 265</sup> Posljednje istraživanje provedeno je 2006. i 2007. godine kada su sudionici navršili 70 godina starosti i više.

### 3.1. ISPITANICI

U istraživanje je uključeno 345 ispitanika koji su sposobni živjeti samostalno, brinuti o sebi i obavljati dnevne aktivnosti. Među ispitanicima je istraživana prevalencija metaboličkog sindroma. Ispitanici ženskog (188) i muškog spola (157) dolaze s područja gradova Zagreba, Virovitice, Splita, Omiša i Visa, starosti od 70 do 93 godine. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, a ispitanici su obaviješteni o prirodi i cilju istraživanja. Nakon obavijesnog pristanka, od svakog su ispitanika prikupljeni osobni podaci (dob, spol) i podaci o čimbenicima koji mogu utjecati na razvoj metaboličkog sindroma (krvni tlak, ovisnost o nikotinu, korištenje lijekova za hipertenziju i ostale bolesti). Liječnički pregled, uzorkovanje krvi i prikupljanje podataka provedeni su u periodu između 7 i 12 sati ujutro. Visina, masa i opseg struka mjereni su prema protokolu Međunarodnog biološkog programa.<sup>266</sup>

Ispitanici su podijeljeni u dvije grupe – grupu ispitanika s metaboličkim sindromom (MetS+) i grupu ispitanika koja nema metabolički sindrom (MetS-). Prisustvo/odsustvo metaboličkog sindroma u svakog ispitanika određeno je prema kriterijima Međunarodnog udruženja za dijabetes (IDF). MetS+ ispitanici imaju opseg struka  $\geq 94$  cm (muškarci) i  $\geq 80$  cm (žene), te bilo koji od dva navedena kriterija: glukoza natašte  $\geq 5,6$  mmolL<sup>-1</sup> (ili ranije dijagnosticirana šećerna bolest i terapija za dijabetes), koncentracija triacilglicerola  $\geq 1,7$



mmolL<sup>-1</sup>, HDL-kolesterol < 1,03 mmolL<sup>-1</sup> za muškarce i < 1,29 mmolL<sup>-1</sup> za žene, i krvni tlak ≥ 130/85 mmHg. Opseg struka je mjereno na sredini između desetog rebra i vrha bokova korištenjem fleksibilnog nerastezljivog plastičnog metra. Krvni tlak je mjereno u sjedećem položaju nakon odmora od 10 do 20 minuta korištenjem živinog sfigmomanometra (Reister, Jungingen, Njemačka). Hipertenzija je definirana kod krvnog tlaka ≥ 130/85 mmHg. Srednji arterijski tlak (MAP, *engl. Mean Arterial Pressure*) računat je po jednadžbi:  $MAP = [(2 \times \text{dijastolički tlak}) + \text{sistolički tlak}] / 3$ .<sup>267</sup> Indeks tjelesne mase (BMI) računat je po formuli: masa (kg) / visina (m)<sup>2</sup>. Status pušača definiran je na sljedeći način: pušači (aktivni pušači i bivši pušači) i nepušači (ispitanici koji nikada nisu pušili).

## 3.2. UZORCI

Uzorci krvi prikupljeni su nakon noćnog posta iz antekubitalne vene. Serum krvi ispitanika korišten je za biokemijske analize, a puna krv na EDTA antikoagulans uzeta je za izolaciju DNA. Za prikupljanje uzoraka korištene su epruvete za izdvajanje seruma (BD Vacutainer, Becton Dickinson, Plymouth, Ujedinjeno Kraljevstvo) i epruvete za izolaciju DNA (K<sub>2</sub>EDTA Vacutainer, Becton Dickinson, Plymouth, Ujedinjeno Kraljevstvo). Uzorci seruma su pohranjeni na -20°C do analize.

### 3.2.1. BIOKEMIJSKE ANALIZE

Biokemijske analize provedene su u Odjelu za kliničko-laboratorijsku dijagnostiku Dječje bolnice Srebrnjak u Zagrebu.

Koncentracija glukoze u serumu, ukupni proteini i C-reaktivni protein (CRP) određivani su standardiziranim metodama na Beckman Coulter AU400 selektivnom autoanalizatoru (Beckman Coulter, Tokyo, Japan) uz korištenje reagenasa istog proizvođača (Beckman Coulter, Hamburg, Njemačka).

Lipidni parametri (koncentracije ukupnog kolesterola, HDL-kolesterola i triacilglicerola) određeni su enzimskim metodama pomoću Roche COBAS MIRA autoanalizatora, korištenjem Boehringer-Mannheim Diagnostics i Hoffmann-La Roche reagenasa (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka). LDL-kolesterol je izračunat prema Friedewaldovoj jednadžbi:

$$[\text{LDL-kolesterol}] = [\text{ukupni kolesterol}] - [\text{triacilglicerol}/2,2] - [\text{HDL-kolesterol}]^{268}$$

Referentni intervali, odnosno preporučene vrijednosti navedenih parametara prikazani su u tablicama 4 i 5.

Tablica 4. Referentni intervali za pojedine parametre laboratorijskih pretraga

PARAMETAR	JEDINICA	REFERENTNI INTERVAL
Glukoza	mmol L <sup>-1</sup>	4,4 – 6,4
Ukupni proteini	g L <sup>-1</sup>	66 do 81
C-REAKTIVNI PROTEIN (CRP)	mg L <sup>-1</sup>	do 5

Tablica 5. Preporučene vrijednosti parametara lipidnog statusa

PARAMETAR	JEDINICA	PREPORUČENE VRIJEDNOSTI
KOLESTEROL - ukupni	mmol L <sup>-1</sup>	< 5,0
TRIACILGLICEROLI	mmol L <sup>-1</sup>	< 1,7
HDL-KOLESTEROL	mmol L <sup>-1</sup>	M > 1,0 ; Ž > 1,2
LDL-KOLESTEROL (rač*)	mmol L <sup>-1</sup>	do 3

\*rač - računski

### 3.3. POSTUPCI U ANALIZI POLIMORFIZAMA U GENOMSKOJ DNA

#### 3.3.1. IZOLACIJA DNA IZ PUNE KRVI

Izolacija DNA iz pune krvi pomoću seta QIAGEN Biosprint 15 DNA i KingFisher® aparature radi se prema niže opisanom postupku. Postupak izolacije DNA osim u priručniku priloženom aparaturi, dostupan je i na web strani proizvođača tehnologije.<sup>269</sup>

Aparatura:

- KingFisher® uređaj (Thermo LabSystems, Izrael)
- vibracijska mješalica TK3S techno (Kartell, Italija)
- vodena kupelj s tresilicom (Bellco Glass Inc., SAD)

- mini centrifuga C-1201 (Labnet International, Inc., SAD)

Pribor:

- automatske pipete od 10 i 1000  $\mu\text{L}$  i odgovarajući sterilni nastavci (Eppendorf Njemačka, Brand SAD)
- mikroeprovete od 1,5 mL (Eppendorf, Njemačka)

Kemikalije:

- Biosprint 15 DNA (Qiagen, Njemačka) set:
  - puferi AW1, AW2, AE, AL
  - proteaza i otapalo proteaze
  - suspenzija magneta MagAttract
  - setovi po 5 plastičnih epruveta u traci
  - setovi po 5 plastičnih navlaka u traci
- 2-propanol (SigmaAldrich Chemie, Njemačka)
- etanol apsolutni 96% p.a. (Kemika, Hrvatska)

Postupak:

Puferi AW1 i AW2 iz Biosprint 15 DNA seta otope se u apsolutnom etanolu, a proteaza u otapalu za proteazu. Vodena kupelj se termostatira na 70°C. U pomično postolje KingFisher uređaja postavi se određeni broj setova epruveta (1 red za 1 uzorak) i setova navlaka za metalne nastavke aparata. U svaku od 5 epruveta unutar jednog seta dodaju se reagensi slijedećim redom:

- 1. epruveta: uzorak (lizat)
- 2. epruveta: 700  $\mu\text{L}$  pufera AW1
- 3. epruveta: 500  $\mu\text{L}$  pufera AW2
- 4. epruveta: 500  $\mu\text{L}$  pufera AW2
- 5. epruveta: 200  $\mu\text{L}$  pufera AE

Lizat se priprema tako da se volumen od 20  $\mu\text{L}$  proteaze pipetira u epruvetu od 1,5 mL, tome se doda 200  $\mu\text{L}$  krvi i potom 200  $\mu\text{L}$  pufera AL. Smjesa se promiješa na vibracijskoj mješalici kroz 15 sekundi i inkubira 10 minuta na 70°C. Doda se 200  $\mu\text{L}$  2-propanola te promiješa na

vibracijskoj mješalici 10 sekundi. Smjesa se centrifugira u mini-centrifugi te prenese u 1 epruvetu seta. U lizat se potom dodaje 30  $\mu\text{L}$  suspenzije magneta MagAttract koja je prije toga otprilike 3 minute miješana pomoću vibracijske miješalice. Pomično se postolje s pripremljenim uzorcima umetne u KingFisher uređaj i pokrene se protokol za izolaciju DNA. Po završetku procesa izolacije izvadi se pomično postolje i izolirana DNA se pipetira iz epruvete broj 5 u sterilnu mikroeprevetu volumena 1,5 mL.

### 3.3.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE DNA

Aparatura:

- spektrofotometar (LKB Biochrom Ultrospec II 4050, UK)

Pribor:

- kivete
- automatske pipete od 10 i 1000  $\mu\text{L}$  i odgovarajući nastavci (Eppendorf Njemačka, Brand SAD)
- odmjerna tikvica od 1000 mL

Kemikalije:

- TE-pufer:

Tris (hidroksimetil) aminometan (Kemika, Hrvatska) (10mM) p.a. 1,21 g

$\text{Na}_2\text{EDTA}$  p.a. (etilendiaminotetraoctena kiselina – dinatrijeva sol)  
(Kemika, Hrvatska) (1mM) 0,37 g

Tris i  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  je potrebno izvagati, prenijeti u odmjernu tikvicu od 1000 mL i nadopuniti sterilnom destiliranom vodom do mjerne oznake volumena. pH pufera se namjesti na 7,5 dodatkom HCl. Ovako pripravljenu otopinu potrebno je sterilizirati autoklaviranjem 20 minuta na 120°C. TE-pufer se čuva na sobnoj temperaturi.

Postupak:

Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije DNA provodi se mjerenjem apsorbancije uzoraka pri valnoj duljini od 260 nm. Otopina DNA prethodno se razrijedi TE-puferom u omjeru 1 : 100 (na 10  $\mu\text{L}$  otopine DNA doda se 990  $\mu\text{L}$  TE-pufera).

Koncentracija DNA izračuna se prema formuli:

$$\gamma_{\text{DNA}} = \text{razrjeđenje} \cdot F \cdot A \text{ [}\mu\text{g/mL]}$$

gdje je F faktor razrjeđenja, a A je apsorbancija.

### 3.3.3. ISPITIVANJE KVALITETE IZOLIRANE DNA

Kvaliteta izolirane DNA ispitana je elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu s etidijevim bromidom upotrebom kade za elektroforezu i ispravljača Power Pac 1000, Bio Rad.

Aparatura:

- kada za elektroforezu model #E0763 (Sigma Chemical Co., SAD)
- ispravljač električne struje (Power Pac 1000, Bio Rad, SAD)
- mikrovalna pećnica (LG, Južna Koreja)
- laboratorijska vaga (Ohaus, USA)
- UV-svjetiljka (LKB Transiluminator 2011 Macrovue, UK)
- digitalni fotoaparati (Olympus, Tokio, Japan)
- češalj za elektroforezu (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)

Pribor:

- automatske pipete od 10 i 1000  $\mu$  i odgovarajući nastavci (Eppendorf Njemačka, Brand SAD)
- odmjerne tikvice od 100 i 1000 mL
- Erlenmayerova tikvica od 250 mL
- cilindar graduirani od 25, 100 i 250 mL

Pripravci:

- 1,5% agarozni gel

Agaroz (SigmaAldrich Chemie, Njemačka)	2,25 g
Destilirana voda	do 147 mL

- Etidijev bromid  
(3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinijev bromid) (SigmaAldrich Chemie, Njemačka)  
10 mg/mL
- 50 x TAE-pufer

Tris (Kemika, Hrvatska)	224 g
Octena kiselina (Kemika, Hrvatska)	57,1 mL
Na <sub>2</sub> -EDTA (Kemika, Hrvatska), 0,5%, pH 7,5	100 mL
Destilirana voda	do 1 L
- 1 x TAE-pufer

50 x TAE-pufer	20 mL
Etidijev bromid	200 µL
Destilirana voda	do 1 L
- Plava boja

Brom-fenol plavo 2% (SigmaAldrich Chemie, Njemačka)	500 µL
Glicerol 50% (Kemika, Hrvatska)	10 mL
10 x TAE-pufer	5 mL
Destilirana voda	do 100 mL

**Postupak:**

Za pripremu 1,5% gela agaroze potrebno je u prethodno istariranu Erlenmeyerovu tikvicu odvagati 2,25 g agaroze i dodati 147 mL destilirane vode. Agarozu se otopi zagrijavanjem do točke vrelišta u mikrovalnoj pećnici. Kada se sadržaj u tikvici ohladi na temperaturu od približno 50°C, tekućoj agarozu doda se 3 mL 50 x TAE pufera i 3 µL otopine etidijeva bromida. Gel se izlije u kalup s nosačem na koji je postavljen češalj za formiranje jažica. Nosač je sastavni dio sustava za elektroforezu. Nakon što gel postane čvrst, nosač se postavi u kadicu za elektroforezu s 1 x TAE puferom. Razina pufera iznad gela mora iznositi 2-3 mm. Češalj se potom ukloni, a u jažice se mikropipetom nanese uzorci koji sadrže 8 µL otopine DNA u TE-

puferu i 3  $\mu\text{L}$  boje brom-fenol plavo. Elektroforeza se odvija 60 minuta pri naponu 140 V. Gel se osvijetli ultraljubičastom svjetlošću kako bi se detektirala DNA, a potom se dokumentira fotografiranjem.

### 3.3.4. METODE GENOTIPIZACIJE

#### 3.3.4.1. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM

Aparatura:

- Gene Amp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, SAD)
- mini centrifuga C-1201 (Labnet International, Inc., SAD)
- mini centrifuga C-1202 (Labnet International, Inc., SAD)
- vibracijska miješalica TK3S techno (Kartell, Italija)

Pribor:

- automatske pipete od 1000  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  i 10  $\mu\text{L}$  te odgovarajući sterilni nastavci (Eppendorf Njemačka, Brand SAD)
- sterilne Multiply®-Pro Biosphere® PCR epruvete od 0,2 mL (SARSTEDT, Njemačka)
- sterilne GeneAmp® PCR epruvete od 0,2 mL (Applied Biosystems, SAD)

Kemikalije:

- sterilna voda za injekcije (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska)
- deoksiribonukleotid-trifosfati 10mM svaki (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka)
- pufer za PCR s  $\text{MgCl}_2$  (10xFast Start Taq Reaction Buffer, Roche Diagnostics GmbH, Njemačka)
- Fast Start Taq DNA polimeraza 5U/ $\mu\text{L}$  (Roche Diagnostics GmbH, Njemačka)
- ishodnice (razlikuju se za svaki ulomak DNA i navedene su u tablici 8)

Lančana reakcija polimerazom (*PCR, engl. polymerase chain reaction*)<sup>270</sup> omogućuje brzo umnažanje odabranog slijeda u genomu više od milijardu puta, čime se DNA odabranog slijeda učinkovito „pročisti“ od ostatka genoma.<sup>271</sup>

Postupak umnažanja DNA u *in vitro* uvjetima provodi se u tri koraka koji obuhvaćaju denaturaciju DNA pri temperaturi 94 do 96°C, vezanje ishodnica pri temperaturi od 58 do 68°C

i sintezu novih lanaca komplementarnih DNA regiji omeđenoj ishodnicama uz termostabilnu polimerazu na 72°C. Novi se lanci u manjoj mjeri razlikuju za svaki pojedini ulomak DNA. Temperature, vremena inkubacije, koncentracija DNA-polimeraze, DNA-kalupa, ishodnica i Mg<sup>2+</sup> iona ovise o analitičkom sastavu i ispitani su za pojedini ulomak DNA. Uvjeti umnažanja pojedinih DNA ulomaka stoga su prikazani u tablici 6. Sastav reakcijskih smjesa za umnažanje pojedinih ulomaka gena nalazi se u tablici 7. Slijed nukleotida za ishodnice gena odabran je prema literaturnim podacima i za svaki polimorfizam naveden u tablici 8. Ponavljanjem triju stupnjeva reakcije 30 do 40 puta sintetizira se milijun kopija određenog ulomka DNA, kojeg nazivamo PCR-ulomkom.

Tablica 6. Uvjeti umnažanja DNA ulomaka

polimorfizam	početna denaturacija $\vartheta/^\circ\text{C} / t/\text{min}$	broj ciklusa	denaturacija $\vartheta/^\circ\text{C} / t/\text{s}$	vezanje ishodnica $\vartheta/^\circ\text{C} / t/\text{s}$	sinteza novog lanca $\vartheta/^\circ\text{C} / t/\text{s}$	završna sinteza $\vartheta/^\circ\text{C} / t/\text{s}$
<i>SNP1</i>	96/5	33	94/30	65/30	72/30	72/7
<i>SNP3</i>	96/5	33	94/30	60/30	72/30	72/7
<i>S19W</i>	96/2	33	94/15	68/20	72/30	72/5
<i>FABP2</i>	94/5	33	94/30	58/45	72/45	72/7

Tablica 7. Sastav reakcijskih smjesa za umnažanje gena za: a) *SNP1*, b) *SNP3* c) *S19W* i d) *FABP2*

a)

<i>SNP1</i>	
Sastav reakcijske smjese	V/ $\mu\text{L}$
sterilna voda	19,85
dNTP	0,5
10X PCR pufer s MgCl <sub>2</sub>	2,5
ishodnica SNP1-F	0,5
ishodnica SNP1-R	0,5
Fast Start Taq DNA polimeraza	0,15
DNA	1,0
UKUPNI VOLUMEN 25 $\mu\text{L}$	



b)

<b>SNP3</b>	
<b>Sastav reakcijske smjese</b>	<b>V/ <math>\mu</math>L</b>
sterilna voda	19,85
dNTP	0,5
10X PCR pufer s MgCl <sub>2</sub>	2,5
ishodnica SNP3-F	0,5
ishodnica SNP3-R	0,5
Fast Start Taq DNA polimeraza	0,15
DNA	1,0
UKUPNI VOLUMEN 25 $\mu$ L	

c)

<b>S19W</b>	
<b>Sastav reakcijske smjese</b>	<b>V/ <math>\mu</math>L</b>
sterilna voda	15,88
dNTP	0,4
10X PCR pufer s MgCl <sub>2</sub>	2,0
ishodnica AV1-F	0,4
ishodnica AV1-R	0,4
Fast Start Taq DNA polimeraza	0,12
DNA	0,8
UKUPNI VOLUMEN 20 $\mu$ L	

d)

<b>FABP2</b>	
<b>Sastav reakcijske smjese</b>	<b>V/ <math>\mu</math>L</b>
sterilna voda	19,85
dNTP	0,5
10X PCR pufer s MgCl <sub>2</sub>	2,5
ishodnica FABP-F	0,5
ishodnica FABP-R	0,5
Fast Start Taq DNA polimeraza	0,15
DNA	1,0
UKUPNI VOLUMEN 25 $\mu$ L	

Tablica 8. Slijed nukleotida za ishodnice gena

gen	naziv ishodnice	slijed ishodnice	dužina ulomka	proizvođač
<b>SNP1</b>	<i>SNP1-F</i>	5'-ACC AAA GGG GCT GCT GTC TCG TGC A-3'	115 pb	TIB MOLBIOL
	<i>SNP1-R</i>	5'-GAG CAT TCC CAA ATG AGC AC-3'		TIB MOLBIOL
<b>SNP3</b>	<i>SNP3-F</i>	5'-GAT TGA TTC AAG ATG CAT TTA GGA C-3'	187 pb	TIB MOLBIOL
	<i>SNP3-R</i>	5'-CCC CAG GAA CTG GAG CGA AAT T-3'		TIB MOLBIOL
<b>S19W</b>	<i>AV1-F</i>	5'-TGC TCA CCT GGG CTC TGG CTC TTC-3'	180 pb	TIB MOLBIOL
	<i>AV1-R</i>	5'-CCA GAA GCC TTT CCGTGC CTG GGC GGC-3'		TIB MOLBIOL
<b>FABP2</b>	<i>fabp -F</i>	5'-ACA GGT GTT AAT ATA GTG AAA AG-3'	180 pb	Sigma Aldrich
	<i>fabp -R</i>	5'-TAC CCT GAG TTC AGT TCC GTC-3'		Sigma Aldrich

Stabilnost umnoženih PCR-ulomaka ovisi o slijedu nukleotida u ulomku. Ulomci se mogu čuvati nekoliko dana pri temperaturi od +4°C ili kroz duži period pri temperaturi -20°C.

### 3.3.4.2. PROVJERA USPJEŠNOSTI UMNAŽANJA ULOMAKA DNA

Kvaliteta ulomaka DNA umnoženih lančanom reakcijom polimerazom provjerena je elektroforezom na 3% - tnom agaroznom gelu s etidijevim bromidom, uz biljeg za provjeru duljine umnoženih DNA ulomaka.

Aparatura:

- kada za elektroforezu model #E0763 (Sigma Chemical Co., SAD)
- ispravljač struje Power Pac 1000 (Bio Rad, SAD)
- mikrovalna pećnica (LG, Južna Koreja)
- laboratorijska vaga (Ohaus, New Jersey, USA)
- UV-svjetiljka (LKB Transiluminator 2011 Macrovue, UK)

- digitalni fotoaparat (Olympus, Japan)

Pribor:

- automatska pipeta od 1000  $\mu\text{L}$  i 10  $\mu\text{L}$  te odgovarajući nastavci (Eppendorf Njemačka, Brand SAD)
- Erlenmeyerova tikvica od 150 mL
- cilindar graduirani 100 mL
- špatula metalna
- češalj za elektroforezu (Sigma Aldrich Chemie, Njemačka)
- mikropruvete od 1,5 mL (Eppendorf, Njemačka)

Kemikalije:

- agarozna za rutinsku uporabu (Sigma Aldrich Chemie, Njemačka)
- destilirana voda
- etidijev bromid (Sigma Aldrich Chemie, Njemačka)
- 50 x TAE pufer
- 1 x TAE pufer
- boja brom-fenol plavo za elektroforezu (Sigma Aldrich Chemie, Njemačka)
- biljeg od 20 bp O'Range Ruler™ DNA Ladder, 0,1  $\mu\text{g}$  /  $\mu\text{L}$  (Fermentas – ThermoFisher Scientific, SAD)

Pripravci:

- 3% agarozni gel

Agarozna (SigmaAldrich Chemie, Njemačka)	2,25 g
Destilirana voda	do 73,5 mL

Postupak:

Postupak pripreme gela i pripravci identični su postupku opisanom u poglavlju 3. 3. 3. Korišten je 3% gel agaroze s 1,5 mL 50X TAE pufera i 3  $\mu\text{L}$  otopine etidijeva bromida. U jažice se mikropipetom nanose uzorci koji sadrže 7  $\mu\text{L}$  ulomaka DNA i 3  $\mu\text{L}$  boje brom-fenol plavo.

U prvu jažicu nanosi se molekularni biljeg od 20 bp O'Range Ruler™ DNA Ladder. Elektroforeza se odvija 30 minuta pri naponu 140 V.

### 3.3.4.3. POLIMORFIZAM DULJINE RESTRIKCIJSKIH ULOMAKA DNA

Polimorfizam duljine restrikcijskih ulomaka (*engl. restriction fragments length polymorphisms, RFLP*) temelji se na utvrđivanju mjesta mutacije PCR-ulomaka cijepanjem pomoću restrikcijskih endonukleaza.

#### 3.3.4.3.1. RAZGRADNJA ULOMAKA DNA S POLIMORFIZMOM SNPI

Aparatura:

- vibracijska mješalica TK3S techno (Kartell, Italija)
- mini centrifuga C-1202 (Labnet International, Inc., SAD)
- vodena kupelj s tresilicom (Bellco Glass Inc., SAD)

Pribor:

- automatske pipete od 1000 µL, 100 µL i 10 µL te odgovarajući sterilni nastavci (Eppendorf Njemačka, Brand SAD)
- sterilne epruvetice MicroAmp® 8-tube strips od 0,2 mL (Applied Biosystems, SAD)

Kemikalije:

- restrikcijski enzim i odgovarajući pufer (Fermentas - ThermoFisher Scientific, SAD):

*Alw44I (ApaLI)* 10 U / µL za razgradnju PCR produkta *SNPI* i 10X pufer Tango™

- sterilna voda za injekcije (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu)

Postupak:

Restrikcijska smjesa je načinjena od 1,25 µL restrikcijskog enzima *Alw44I (ApaLI)*, 2 µL odgovarajućeg pufera i 7 µL sterilne vode. Nakon što je na 3% gelu agaroze utvrđeno postojanje ulomka DNA odgovarajuće veličine, restrikcijskoj smjesi je dodano 6 µL uzorka umnoženog

lančanom reakcijom polimeraze. Inkubacija se odvijala 16 sati u vodenoj kupelji s tresilicom. Enzimska razgradnja enzimom *Alw44I* (*ApaLI*) provodi se pri temperaturi 37°C.

#### 3.3.4.3.2. RAZGRADNJA ULOMAKA DNA S POLIMORFIZMOM *SNP3*

Aparatura:

- vibracijska mješalica TK3S techno (Kartell, Italija)
- mini centrifuga C-1202 (Labnet International, Inc., SAD)
- vodena kupelj s tresilicom (Bellco Glass Inc., SAD)

Pribor:

- automatske pipete od 1000 µL, 100 µL i 10 µL te odgovarajući sterilni nastavci (Eppendorf Njemačka, Brand SAD)
- sterilne epruvetice MicroAmp® 8-tube strips od 0,2 mL (Applied Biosystems, SAD)

Kemikalije:

- restrikcijski enzim i odgovarajući pufer (Fermentas - ThermoFisher Scientific, SAD): *TruII* (*MseI*) 10 U / µL za razgradnju PCR produkta *SNP3* i 10X pufer R
- sterilna voda za injekcije (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska)

Postupak:

Smjesa za restrikciju načinjena je od 0,31 µL restrikcijskog enzima *TruII* (*MseI*), 0,5 µL odgovarajućeg pufera i 1,75 µL sterilne vode. Nakon što je na 3% gelu agaroze utvrđeno postojanje ulomka DNA odgovarajuće veličine, restrikcijskoj smjesi je dodano 1,2 µL uzorka umnoženog lančanom reakcijom polimeraze. Za restrikcijsku smjesu s enzimom *TruII* (*MseI*) razgradnja se provodi 5 sati na temperaturi 65°C.

#### 3.3.4.3.3. RAZGRADNJA ULOMAKA DNA S POLIMORFIZMOM *S19W*

Aparatura:

- vibracijska mješalica TK3S techno (Kartell, Italija)
- mini centrifuga C-1202 (Labnet International, Inc., SAD)
- vodena kupelj s tresilicom (Bellco Glass Inc., SAD)

Pribor:

- automatske pipete od 1000  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  i 10  $\mu\text{L}$  te odgovarajući sterilni nastavci (Eppendorf Njemačka, Brand SAD)
- sterilne epruvetice MicroAmp® 8-tube strips od 0,2 mL (Applied Biosystems, SAD)

Kemikalije:

- restrikcijski enzim i odgovarajući pufer (Fermentas - ThermoFisher Scientific, SAD):  
*Eco52I (EagI)* 10 U /  $\mu\text{L}$  za razgradnju PCR produkta *S19W* i 10X pufer *Eco52I*
- sterilna voda za injekcije (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska)

Postupak:

Postupak je jednak opisanom pod 3. 3. 4. 3. 2., s time da se za restrikcijsku smjesu s enzimom *Eco52I (EagI)* inkubacija odvija 16 sati u vodenoj kupelji s tresilicom pri temperaturi 37°C.

#### 3.3.4.3.4. RAZGRADNJA ULOMAKA DNA S POLIMORFIZMOM FABP2

Aparatura:

- vibracijska mješalica TK3S techno (Kartell, Italija)
- mini centrifuga C-1202 (Labnet International, Inc., SAD)
- vodena kupelj s tresilicom (Bellco Glass Inc., SAD)

Pribor:

- automatske pipete od 1000  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  i 10  $\mu\text{L}$  te odgovarajući sterilni nastavci (Eppendorf Njemačka, Brand SAD)
- sterilne epruvetice MicroAmp® 8-tube strips od 0,2 mL (Applied Biosystems, SAD)

Kemikalije:

- restrikcijski enzim i odgovarajući pufer (Fermentas - ThermoFisher Scientific, SAD):  
*HhaI* 10 U /  $\mu\text{L}$  za razgradnju PCR produkta *FABP2* i 10X pufer Tango™
- sterilna voda za injekcije (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu)

Postupak:

Postupak je identičan opisanom u potpoglavlju 3. 3. 4. 3. 1. uz razgradnju enzimom *HhaI*.

#### 3.3.4.4. DETEKCIJA POLIMORFIZAMA *SNP1*, *SNP3*, *S19W* i *FABP2*

##### 3.3.4.4.1. DETEKCIJA POLIMORFIZMA *SNP1*

Nakon razgradnje produkti se oboje bojom brom-fenol plavo i nanose na 3% gel agaroze kako bi se fragmenti razdvojili u električnom polju. U prvu jažicu unosi se biljeg kako bi se mogla utvrditi veličina odvojenih fragmenata.

Aparatura:

- kada za elektroforezu model #E0763 (Sigma Chemical Co., SAD)
- ispravljač struje Power Pac 1000 (Bio Rad, SAD)
- mikrovalna pećnica (LG, Južna Koreja)
- laboratorijska vaga (Ohaus Adventurer™Pro, SAD)
- UV-svjjetiljka (LKB Transiluminator 2011 Macrovue, UK)
- digitalni fotoaparati (Olympus, Japan)

Pribor:

- automatska pipeta od 1000  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  i 10  $\mu\text{L}$  te odgovarajući sterilni nastavci (Eppendorf Njemačka, Brand SAD)
- Erlenmeyerova tikvica od 150 mL
- cilindar graduirani 100 mL

- špatula metalna
- češalj za elektroforezu (Sigma Aldrich Chemie, Njemačka)

Kemikalije:

- agaroza za rutinsku uporabu (Sigma Aldrich Chemie, Njemačka)
- destilirana voda
- etidijev bromid (3,8 – diamino – 5 – etil – 6 - fenilfenantridinijev bromid )
- 1X TAE pufer
- boja brom-fenol-plavo za elektroforezu (Sigma Aldrich Chemie GmbH)
- biljeg od 20 bp O'Range Ruler™ DNA Ladder, 0,1 µg / µL (Fermentas - ThermoFisher Scientific, SAD)

Postupak:

Za detekciju polimorfizama 3% gel agaroze se priprema kao što je opisano u poglavlju 3. 3. 4. 2. Elektroforeza se odvija pri 140 V tijekom 60 minuta. Po završetku elektroforeze gel se osvjetli UV - svjetiljkom, fragmenti se vizualiziraju a potom ih dokumentiramo fotografiranjem.

#### 3.3.4.4.2. DETEKCIJA POLIMORFIZMA SNP3

Nakon digestije produkti se nanose na DNA-čip pripremljen neposredno prije analize, a potom se uzorci s čipa analiziraju bioanalizatorom.

Aparatura:

- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc. SAD)
- mješalica IKA – model MS2-S8/MS2-S9 (Ika, SAD)
- osobno računalo (PC) s programskom podrškom 2100 Expert Software
- mikrocentrifuga (Eppendorf, Njemačka)

Pribor:

- automatske pipete od 1000 µL, 100 µL i 10 µL te odgovarajući nastavci (Eppendorf, Brand GMBH + CO KG, Njemačka)



- postolje za pripravu čipa (Agilent Technologies, Inc. SAD)
- šprica (Agilent Technologies, Inc. SAD)
- zaporna ura Oregon Scientific model No. TR118, SAD
- filtri za mikrocentrifugu
- DNA 1000 čip (LabChip® Caliper Technologies Corp., SAD)
- čip za čišćenje elektroda (LabChip® Caliper Technologies Corp., SAD)

#### Kemikalije:

- Agilent DNA 1000 Kit:
  - DNA 1000 ladder – „ljestve“
  - DNA 1000 biljeg 15/1500 bp
  - DNA koncentrat boje (Molecular Probes, Inc., SAD)
  - DNA gel matriks (matrica)
- sterilna voda za injekcije (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu)

#### Postupak:

Prije provođenja protokola za pripremu čipa, potrebno je ispuniti određene preuvjete: potrebno je zamijeniti špricu sa svakim novim DNA kitom, a isto tako i čip za čišćenje elektroda; podesiti baznu ploču nosača za nanašanje uzoraka na poziciju C, osloboditi polugu klipa i podesiti je na najnižu poziciju na nosaču (Slika 28.), odabrati odgovarajuću vrstu čipa na bioanalizatoru, podesiti broj okretaja na posebnoj mješalici što pripada analizatoru na 2400 okretaja u minuti i pokrenuti program analizatora (2100 Expert Software) na računalu.



Slika 28. Bazna ploča nosača za nanašanje uzoraka i poluga klipa (prilagođeno prema <sup>272</sup>)

Reagensi se čuvaju pri temperaturi 4°C. Kako bi se uravnotežili na sobnu temperaturu potrebno ih je izvaditi iz hladnjaka 30 minuta prije uporabe. Uzorci se prije analize također čuvaju na sobnoj temperaturi. Analizu čipa potrebno je pokrenuti u roku od pet minuta nakon pripreme zbog mogućeg isparavanja reagenasa što može dovesti do slabih rezultata.

Nakon što boja i DNA gel matriks odstoje 30 minuta na sobnoj temperaturi, pripravlja se njihova mješavina. Koncentrat boje se miješa na mješalici 10 sekundi i vrlo kratko centrifugira kako bi se spustio njen sadržaj u mikroepreveti. 25 µL koncentrata boje pipetom se prenese u mikroeprevetu s DNA gel matriksom. Mješavina se miješa na mješalici 10 sekundi a potom prebaci u mikroeprevetu s filtrom za centrifugiranje, te centrifugira 15 minuta na sobnoj temperaturi pri 2240 g ± 20% (što odgovara 6000 okretaja u minuti za Eppendorf mikrocentrifuge). Filtar se odbaci, a mikroepreveta s pripravljenom mješavinom boje i gela omota se aluminijskom folijom jer se boja raspada kad je izložena svjetlosti, čime se smanjuje intenzitet signala tijekom analize. Mješavinu je potrebno upotrijebiti unutar 4 tjedna.

DNA čip se izvadi iz zaštitnog omota i postavi na postolje za pripravu čipa (Slika 29). Klip šprice mora biti namješten na volumen od 1 mL. 9 µL mješavine boje i gela pipetom se unese na dno posebno označene jažice. Time se sprječava nastajanje velikog mjehurića zraka ispod mješavine. Postolje za pripravu čipa se zatvori. Pri tome se čuje specifičan zvuk zaključavanja brave – ukoliko zvuk izostane, postolje za pripravu čipa nije ispravno zatvoreno. Klip šprice

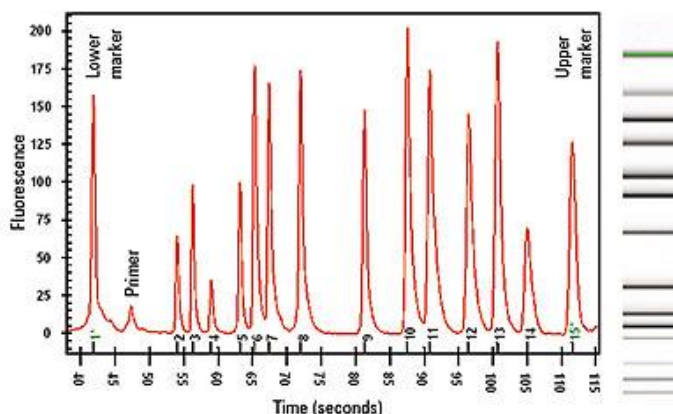
pritisne se prema dolje sve dok je ne zahvati isječak poluge. Nakon točno 60 sekundi otpusti se poluga i klip šprice se otpušta. Vizualno se pregleda da li se klip vratio barem do oznake od 0,3 mL. Nakon 5 sekundi, klip se polagano vrati na oznaku 1 mL. Postolje se otvori, te potom unese 9  $\mu$ L mješavine boje i gela u druge dvije označene jažice. U jažice za uzorke i ladder pipetom se unese 5  $\mu$ L biljega. 1  $\mu$ L laddera se unese u jažicu predviđenu za ladder. U svaku od 12 jažica za uzorke pipetom se unese po 1  $\mu$ L uzorka. Čip s nanešenim uzorcima horizontalno se postavi u posebnu mješalicu za čipove (Slika 30). Nanešeni uzorci i biljeg miješaju se točno 60 sekundi pri 2400 okretaja u minuti. Čip je moguće pravilno smjestiti u mješalicu i analizator samo na jedan način. Ovako pripravljen čip unutar 5 minuta potrebno je umetnuti u bioanalizator i pokrenuti analizu. Uzorci se gibaju kroz mikrokanale i elektroforetski razdvajaju. Komponente se detektiraju na temelju fluorescencije i prevode u slike nalik fragmentima u gelu i elektroferograme sa šiljcima. Bioanalizator s visokom rezolucijom razlikuje fragmente do 5bp, istovremeno detektira vrlo male i vrlo velike fragmente (druga vrsta DNA čipa), te male fragmente koje nije moguće detektirati na gelu. Rezultati se prikazuju na ekranu računala, pohranjuju i po potrebi ispisuju (Slika 31).



Slika 29. Agilent DNA 1000 čip, bioanalizator i postolje za pripravu čipa (prilagođeno prema 273)



Slika 30. IKA mješalica

Slika 31. Očekivani prikaz rezultata  
(prilagođeno prema <sup>274</sup>)

#### 3.3.4.4.3. DETEKCIJA POLIMORFIZMA *S19W*

Aparatura, pribor, kemikalije i postupak za detekciju polimorfizma *S19W* jednaki su onima opisanim u poglavlju 3.3.4.4.2.

#### 3.3.4.4.4. DETEKCIJA POLIMORFIZMA *FABP2*

Aparatura, pribor, kemikalije i postupak za detekciju polimorfizma *FABP2* jednaki su onima opisanim u poglavlju 3.3.4.4.1.

### 3.4. EKSTRAKCIJA UKUPNIH LIPIDA IZ SERUMA I PRIPREMA METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA

Ukupni lipidi su iz seruma ekstrahirani prilagođenom metodom po Kishino i sur.<sup>275</sup> prema kojoj su ujedno pripremljeni i metilni esteri masnih kiselina.

Aparatura:

- centrifuga Centric 322A (Tehtnica, Slovenija)
- vibracijska mješalica EV-202 (Tehtnica, Slovenija)

- uparivač Univapo 100 H s jedinicom za hlađenje Unicryo MC 2L (Uniequip, Njemačka)
- termostat BTE-S (TMA-termo medicinski aparati, Bodalec & Havoić, Hrvatska)

## Pribor:

- automatske pipete od 1000  $\mu$ L, 100  $\mu$ L i 10  $\mu$ L te odgovarajući nastavci (Eppendorf Njemačka, Brand SAD)
- staklene epruvete s navojem i silikonskim čepom
- epruvete za uparavanje

## Kemikalije:

- kloroform  $\text{CHCl}_3$  (J.T. Baker, SAD)
- metanol  $\text{CH}_3\text{OH}$  (J.T. Baker, SAD)
- butilhidroksitoluen (BHT) (2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol)  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$
- redestilirana voda
- heksan  $\text{C}_6\text{H}_{14}$
- kloridna kiselina  $\text{HCl}$ , konc. 36,5 % (Kemika, Hrvatska)
- heptadekanska kiselina  $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$  (C17:0) - interni standard (SigmaAldrich Chemie, Njemačka)
- bezvodni natrijev sulfat  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Kemika, Hrvatska)

## Uzorak:

- serum ispitanika

## Pripravci:

- smjesa kloroform : metanol ( $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} = 2 : 1$  v/v)  
200 mL kloroforma  
100 mL metanola
- smjesa kloroform : metanol ( $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} = 2 : 1$  v/v) s BHT  
100 mL smjese kloroform : metanol

10 mg BHT

- Metanolna HCl

8,6 mL koncentrirane kloridne kiseline HCl

nadopuniti do 100 mL metanolom CH<sub>3</sub>OH

- Interni standard C17:0

0,5 mg/mL heptadekanske kiseline C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> u heksanu

Postupak:

Ukupni lipidi iz uzorka izdvajaju se ekstrakcijom s organskim otapalima. U 8 mL smjese kloroform : metanol s BHT, doda se 0,4 mL seruma (ili 0,2 mL seruma + 0,2 mL redestilirane vode). Sadržaj epruvete miješa se 10 minuta, a potom se doda 2 mL vode i miješa još 1 minutu. Zatim slijedi centrifugiranje pri 2000 o/min, kroz 5 minuta na sobnoj temperaturi. Donji sloj odvoji se u prethodno izvaganu epruvetu i upari do suha u vakuum uparivaču. Ponovnim vaganjem određuje se masa ukupnih lipida u uzorku seruma. Ekstrahiranim lipidima dodaje se 0,1 mL internog standarda. Sadržaj epruvete se upari do suha. Uparenom ostatku doda se 2 mL metanolne HCl. Epruvete se stavljaju na hidrolizu u termostat na 100 °C kroz 45 minuta. Stvaraju se esterske veze između masnih kiselina i metanola, te nastaju metilni esteri masnih kiselina. Ispiranje se izvede četiri puta s 2 mL petroletera i dva puta s 2 mL redestilirane vode. Kako bi se uklonio višak vode, uzorku se dodaje bezvodni natrijev sulfat i ostavi preko noći. Nakon filtriranja uzorci se upare do suhog, epruvete se propušu dušikom i zatvore. Na taj način pripremljeni uzorci čuvaju se u atmosferi dušika pohranjeni na -20°C do analize plinskom kromatografijom.

### 3.5. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Aparatura:

- plinski kromatograf SRI 8610C (SRI Instruments Chromatography Systems, USA) opremljen plameno ionizacijskim detektorom i kapilarnom kolonom DB-WAX duljine 60 m, unutarnjeg promjera 0,25 mm, debljine aktivnog sloja 0,25 µm (Agilent J&W, SAD)
- računalo s programskom podrškom Peak Simple 3D 2000 za računalni sustav Windows

- plin nosač: vodik, protoka 60 mL/min u split modu

Postupak:

Upareni ekstrakti metilnih estera masnih kiselina otopljeni su u kloroformu te injektirani u plinski kromatograf. Temperaturni uvjeti kromatografiranja su: početna temperatura kolone od 150°C zadržana je 3 minute, potom slijedi zagrijavanje 8°C u minuti do 220°C i kontinuirano zadržavanje na 220°C 30 minuta. Temperatura injektora bila je 250°C, a temperatura detektora 260°C. Ukupno trajanje programa iznosilo je 45 minuta po uzorku. Sastav masnih kiselina određuje se prolaskom uzorka kroz kolonu, a očitava na detektoru plinskog kromatografa. Rezultati se prikazuju na ekranu računala u obliku kromatograma s vrškovima (peakovima) različitih amplituda. Kvantitativno određivanje pojedinih masnih kiselina provedeno je uspoređivanjem površine vrška pojedine masne kiseline s površinom vrška internog standarda C17:0 dodanog tijekom metilacije masnih kiselina. Kromatogrami su obrađeni računalnim programom Peak Simple 3D 2000.

### 3.6. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Za statističku obradu rezultata korišten je paket SPSS za Windows 20,0 (IBM, SAD). Kategorijalne varijable su uspoređivane Pearsonovim  $\chi^2$ -testom ili Fisherovim egzaktnim testom. Distribucija normalnosti za kontinuirane varijable određena je Leveneovim testom. Kontinuirane varijable s normalnom distribucijom izražene su kao aritmetička sredina i pripadajuća standardna devijacija, a one bez normalne distribucije izražene su kao medijan i 25-ti i 75-ti percentil. Grupna usporedba kontinuiranih varijabli načinjena je Studentovim t-testom i Mann-Whitney testom, prema normalnosti distribucije.

Frekvencije alela i genotipova izračunate su ručno. Hardy-Weinbergova ravnoteža između dobivenih i očekivanih frekvencija testirana je hi-kvadrat testom ( $\chi^2$  testom). Povezanost neravnoteže između SNP-ova određena je pomoću alata CubeX.<sup>275</sup> Omjer izgleda (rizika) prije i nakon prilagodbe kovarijata (dob, spol, opseg struka, status pušač - nepušač, terapija antihipertenzivima, hipolipemicima, antidijabeticima, koncentracije glukoze, triacilglicerola, ukupnog kolesterola, HDL-kolesterola i LDL-kolesterola u serumu) izračunate

su logističkom regresijom. Varijable su izražene kao aritmetička sredina s pripadajućom standardnom devijacijom ili medijan i interkvartilno raspršenje (raspon) prema normalnosti distribucije. Razina statističke značajnosti određena je na 0,05.





## § 4. REZULTATI

Analize su napravljene na ukupno 229 ispitanika s metaboličkim sindromom i 116 ispitanika bez metaboličkog sindroma prema IDF kriterijima. Tablica 9 prikazuje osnovne karakteristike. Frekvencije spola, hipertenzije, pušenja i terapije prikazane su kao apsolutna vrijednost i postotak te testirane  $\chi$  - testom. Kao što je i očekivano temeljem IDF odabirnih kriterija, ispitanici s metaboličkim sindromom imaju značajno veću učestalost hipertenzije. Među ispitanicima s metaboličkim sindromom je i znatno veći broj pušača. Kontinuirane varijabe testirane su t- testom ili Mann-Whitney- testom s obzirom na normalnost raspodjele podataka.

### 4.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE ISPITANIKA OBZIROM NA PRISUTNOST METABOLIČKOG SINDROMA

Dob i spol ispitanika koji su sudjelovali u istraživanju, lipidni status i ostali parametri navedeni su u Tablici 9.

Tablica 9. Osnovne karakteristike ispitanika obzirom na prisutnost metaboličkog sindroma

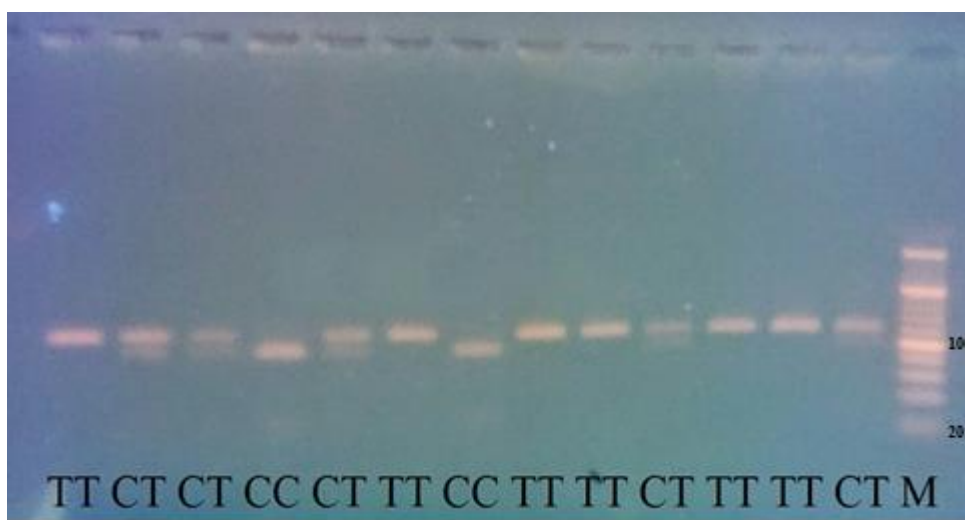
Parametar		MetS (+) N=229	MetS(-) N=116	p- vrijednost
Dob, godine		77±4	78±5	0,051
Spol	M	102 (45%)	55 (47%)	0,613
	Ž	127 (55%)	61 (53%)	
Hipertenzija	da	212 (93%)	95 (82%)	0,003
	ne	17 (7%)	21 (18%)	
Pušenje	da	60 (26%)	17 (15%)	0,017
	ne	169 (74%)	99 (85%)	
Hipolipemička terapija	da	32 (14%)	9 (8%)	0,131
	ne	197 (86%)	107 (92%)	
Opseg struka, cm		102±10	94±17	0,040
Indeks tjelesne mase, BMI kg m <sup>-2</sup>		29,4±3,4	26,7±3,8	< 0,001
Glukoza natašte, mmol L <sup>-1</sup>		7,1±2,7	5,1±1,2	< 0,001
Ukupni kolesterol, mmol L <sup>-1</sup>		5,4±1,2	5,4±1,0	0,637
HDL-kolesterol, mmol L <sup>-1</sup>		1,1±0,3	1,5±0,4	< 0,001
LDL-kolesterol, mmol L <sup>-1</sup>		3,4±1,1	3,3±1,0	0,459
Ukupni proteini, g L <sup>-1</sup>		71,8±5,1	72,0±5,7	0,688
Triacilgliceroli, mmol L <sup>-1</sup>		Medijan (IKR) 1,83 (1,13)	Medijan (IKR) 1,14 (0,53)	< 0,001
BMI - indeks tjelesne mase ( <i>engl. body mass index</i> ); IKR – interkvartilni raspon				

Pearsonov hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) test korišten je za testiranje kategorijalnih varijabli između MetS(+) i MetS(-). Studentov T-test korišten je za usporedbu kontinuiranih varijabli između dvije skupine ispitanika s izuzetkom koncentracija triacilglicerola. Mann-Whitney test korišten je za usporedbu koncentracija triacilglicerola između dvije skupine ispitanika.

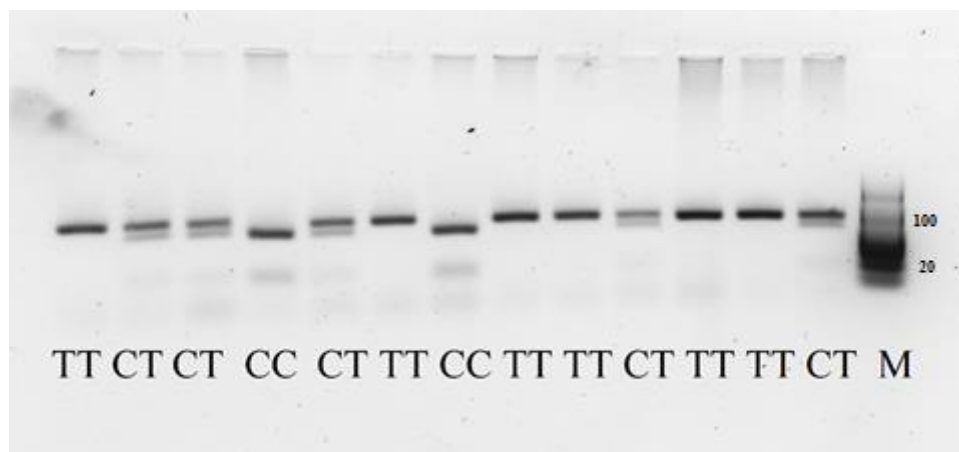
#### 4.2. POLIMORFIZAM SNPI GENA *ApoA5*

Odgovarajući ulomci DNA podvrgnuti su razgradnji pomoću restrikcijskog enzima *Alw44I* (*ApaLI*) za PCR produkt *SNPI* (*1259T>C*). Postupci i uvjeti razgradnje opisani su u poglavlju 3. 3. 4. 3. 1. Neki od rezultata analize prikazani su na slici 32. A i B. A Elektroforeza na agaroznom gelu uz etidijev bromid; B Elektroforeza provedena na agaroznom gelu uz lonza boju.

A



B



Slika 32. Elektroforeza PCR ulomaka za polimorfizme gena *SNPI* (*1259T>C*) nakon razgradnje restrikcijskom endonukleazom *Alw44I* (*ApaLI*) na 3 %-tnom agaroznom gelu. Ulomak duljine 115 pb koji se ne cijepa na fragmente predstavlja „divlji“ tip (TT homozigot). Heterozigot CT se cijepa na fragmente 95 pb i 20 pb no ima i fragment od 115 pb. CC

homozigot se u potpunosti cijepa na fragmente 95 pb i 20 pb. Fragment od 20 pb brzo migrira u agaroznom gelu.

#### 4.3. POLIMORFIZAM *SNP3* GENA *ApoA5*

Odgovarajući ulomci DNA podvrgnuti su razgradnji pomoću restrikcijskog enzima *TruII* (*MseI*) za PCR produkt *SNP3*.

Postupci i uvjeti razgradnje opisani su u poglavlju 3. 3. 4. 3. 2.

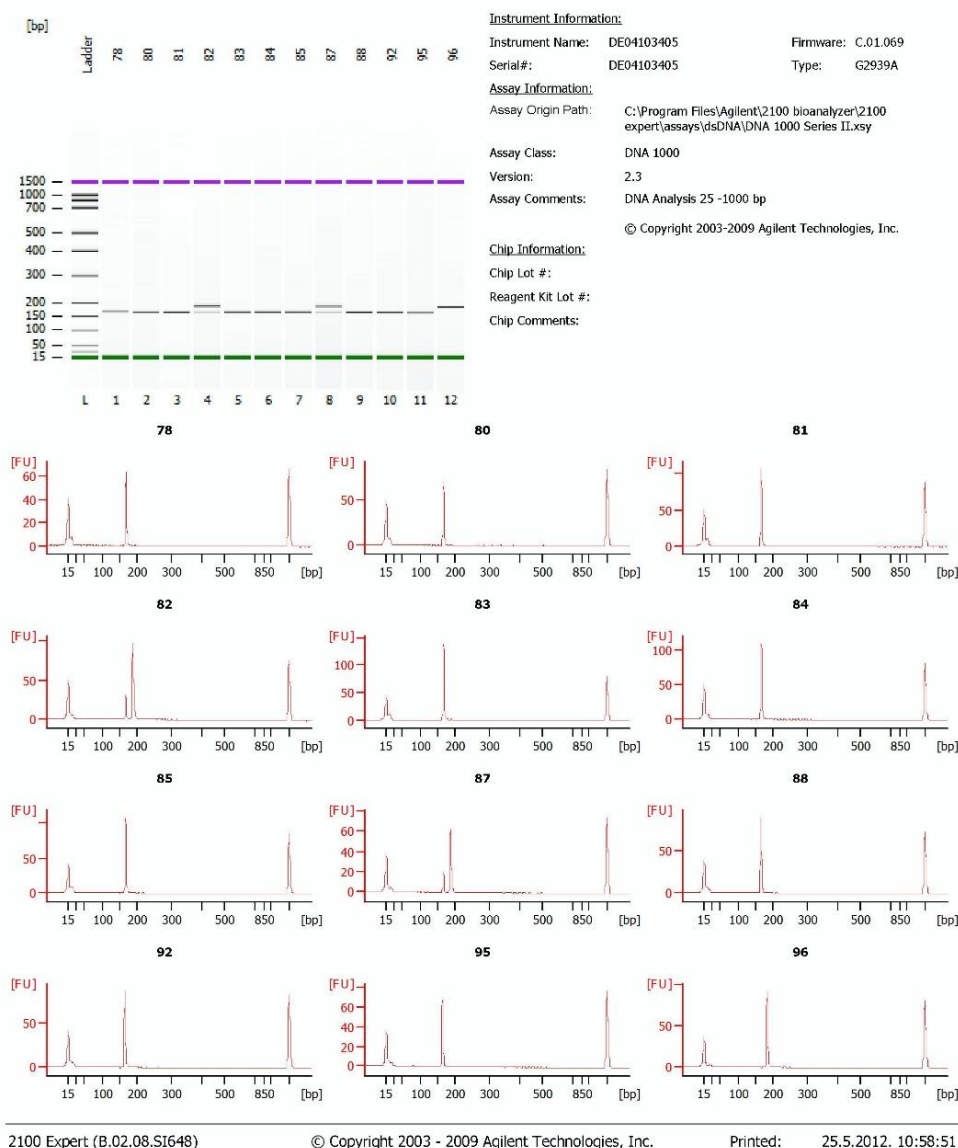
Postupak detekcije polimorfizama opisan je u poglavlju 3. 3. 4. 4. 2

2100 expert\_DNA 1000\_DE04103405\_2012-05-25\_10-15-48.xad

Page 1 of 17

Assay Class: DNA 1000  
 Data Path: C:\...-25\2100 expert\_DNA 1000\_DE04103405\_2012-05-25\_10-15-48.xad  
 Created: 25.5.2012. 10:15:48  
 Modified: 25.5.2012. 10:56:44

## Electrophoresis File Run Summary



Slika 33. Elektroforeza PCR ulomaka za polimorfizam gena *SNP3* nakon razgradnje enzimom *TruII (MseI)* na DNA čipu. Rijetki tip TT homozigot nema *TruII (MseI)* restriksijsko mjesto i na gelu migrira kao jedan fragment od 187 pb. „Divlji“ tip se potpuno cijepa na fragmente od 167 pb i 20 pb (GG homozigot). Ulomak duljine 187 pb koji se cijepa na fragmente 167 pb i 20 pb no ima i fragment od 187 pb je heterozigot GT. Ulomci od 20 pb brzo migriraju i nisu detektibilni na gelu.

---

#### **4.4. POLIMORFIZAM *S19W* GENA *ApoA5***

Odgovarajući ulomci DNA podvrgnuti su razgradnji pomoću restrikcijskog enzima *Eco52I* (*EagI*) za PCR produkt *S19W*. Postupci i uvjeti razgradnje opisani su u poglavlju 3. 3.

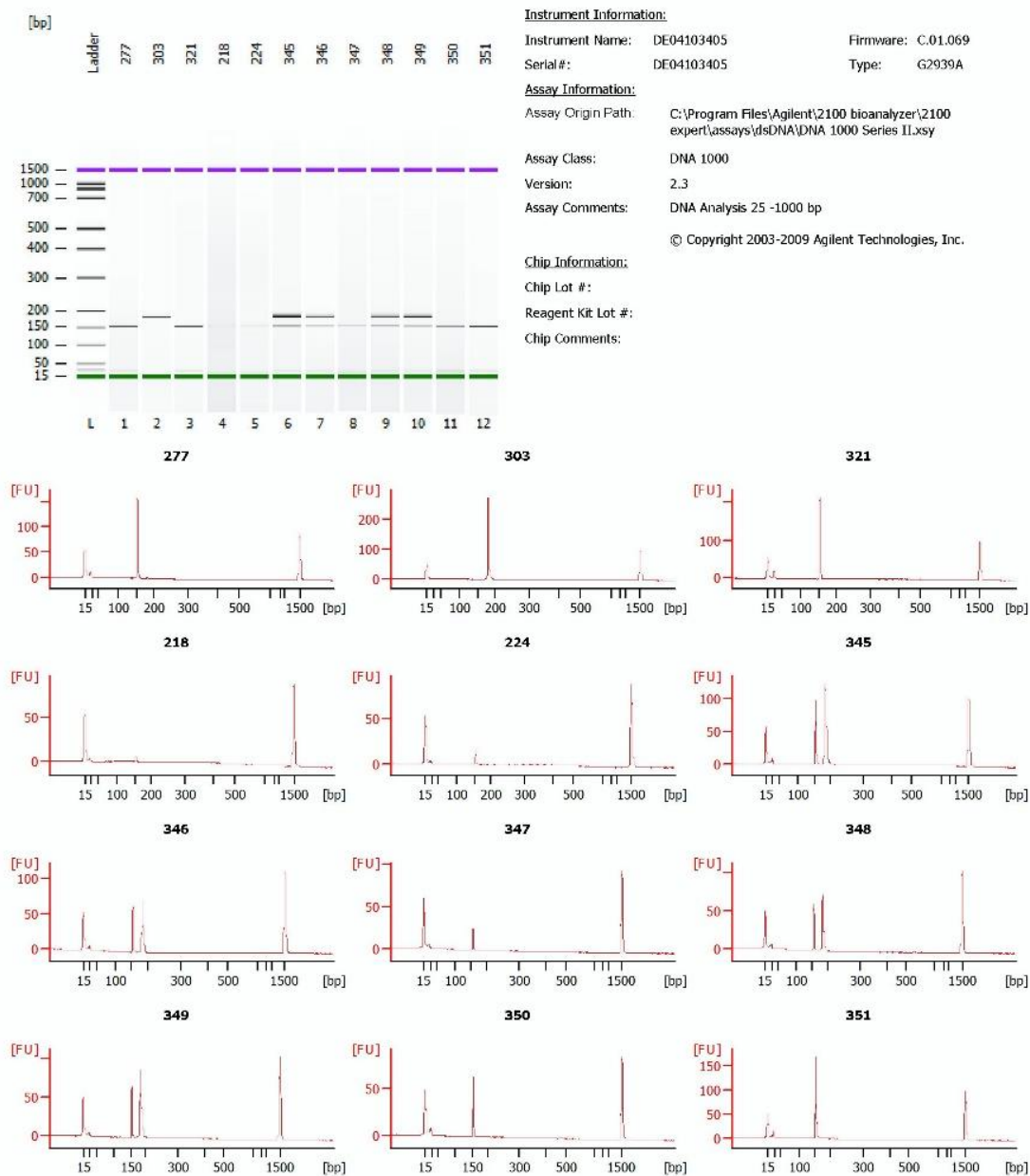
4. 3. 2. Postupak detekcije polimorfizama opisan je u poglavlju 3. 3. 4. 4. 2.

2100 expert\_DNA 1000\_DE04103405\_2012-03-30\_12-52-50.xad

Page 1 of 17

Assay Class: DNA 1000  
 Data Path: C:\...-30\2100 expert\_DNA 1000\_DE04103405\_2012-03-30\_12-52-50.xad

Created: 30.3.2012. 12:52:50  
 Modified: 30.3.2012. 13:33:45

**Electrophoresis File Run Summary**

2100 Expert (B.02.08.SI648)

© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Printed: 30.3.2012. 13:36:45

Slika 34. Elektroforeza PCR ulomaka za polimorfizam gena *SI9W* (56C>G) nakon razgradnje restrikcijskim enzimom *Eco52I* (*EagI*) na DNA čipu. CC homozigot („rijetki tip“) nema *Eco52I* (*EagI*) restrikcijsko mjesto i na gelu migrira kao jedan fragment od



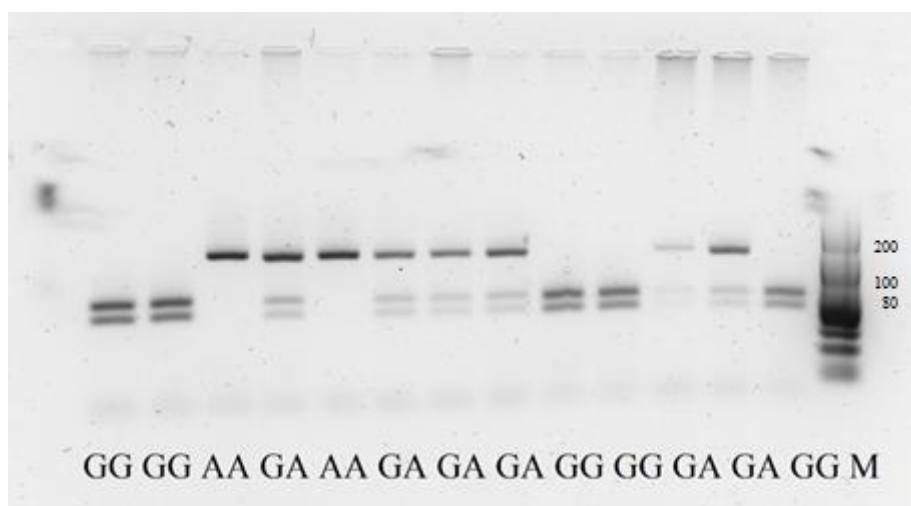
180 pb. „Divlji“ tip se potpuno cijepa na fragmente od 155 pb i 25 pb (GG homozigot).

Ulomak duljine 180 pb koji se cijepa na fragmente 155 pb i 25 pb no ima i fragment od

180 pb je heterozigot CG.

#### **4.5. POLIMORFIZAM GENA *FABP2***

Odgovarajući ulomci DNA podvrgnuti su razgradnji pomoću restrikcijskog enzima *HhaI* za PCR produkt *FABP2*. Postupci i uvjeti razgradnje opisani su u poglavlju 3. 3. 4. 3. 1. Neki od rezultata analize prikazani su na slici 35. A i B. Na slici A prikazana je elektroforeza na agaroznom gelu uz etidijev bromid, a na slici B elektroforeza provedena na agaroznom gelu uz lonza boju.

AB

Slika 35. Elektroforeza PCR ulomaka za polimorfizam gena *FABP2* nakon razgradnje restrikcijskom endonukleazom *HhaI* na 3 % - tnom agaroznom gelu.

PCR produkti s Thr54 nemaju *HhaI* restrikcijsko mjesto, stoga AA homozigot (Thr/Thr „rijetki“ tip) na gelu migrira kao jedan fragment od 180pb. „Divlji“ tip se potpuno cijepa na fragmente od 99 pb i 81 pb (GG ili Ala/Ala homozigot). Ulomak duljine 180 pb koji se cijepa na fragmente od 99 pb i 81 pb no ima i fragment od 180 pb je heterozigot GA tj. Ala/Thr.

#### **4.6. GENOTIPOVI I FREKVENCije ALELA U GRUPAMA ISPITANIKA MetS(+) i MetS(-) ZA TRI GENSKE VARIJANTE *ApoA5***

Tablica 10 prikazuje genotipove i frekvencije alela u obje grupe ispitanika za tri genske varijante gena *ApoA5*. Opažene frekvencije genotipova u obje grupe ispitanika bile su u Hardy Weinberg ravnoteži za sva tri *ApoA5* SNP polimorfizma. Polimorfizmi *SNP1* i *SNP3* u povezanoj su neravnoteži ( $D' = 0,863$ ,  $r^2 = 0,709$ ). *S19W* nije u povezanoj neravnoteži s *SNP1* ( $D' = 0,138$ ,  $r^2 = 0,0001$ ) i *SNP3* ( $D' = 0,547$ ,  $r^2 = 0,0008$ ). Genotipovi i frekvencije alela tri različita *ApoA5* polimorfizma jednog nukleotida nisu se razlikovali između grupa ispitanika s MetS+ i MetS-. Omjeri izgleda (rizika) OR ne indiciraju rizik različitih genetičkih varijanti za razvoj metaboličkog sindroma. Genotipovi s dva najzastupljenija alela razmatrana su kao podgrupa ne-nositelja minornih alela, dok su heterozigotni genotipovi i genotipovi s oba minorna alela razmatrani kao nositelji.

Tablica 10. Genotipovi i frekvencije alela između subjekata s i bez MetS

	MetS(+)		MetS(-)		P ( $\chi^2$ )	OR (interval pouzdanosti 95%)	OR nakon korekcije (interval pouzdanosti 95%)
<i>SNP1 (c.1259T&gt;C)</i>							
C-ne-nositelji	179	(0,81)	93	(0,86)		1,00	1,00
C-nositelji (hetero)	41	(0,19)	14	(0,14)	0,250	1,45	1,28
C-nositelji (homo)	1		1			(0,77-2,76)	(0,68-2,42)
						P=0,251	P=0,447
T	399		200		0,405		
C	43		16				
<i>SNP3 (-1131T&gt;C)</i>							
C-ne-nositelji	180	(0,81)	93	(0,83)		1,00	1,00
C-nositelji	41	(0,19)	18	(0,17)	0,662	1,14	1,15
C-nositelji (homo)	1		1			(0,63-2,07)	(0,63-2,11)
						P=0,663	P=0,645
T	401		204		0,861		
C	43		20				
<i>SI9W (c.56C&gt;G)</i>							
W-ne-nositelji	184	(0,81)	92	(0,81)		1,00	1,00
W-nositelji (hetero)	41	(0,19)	22	(0,19)	0,937	0,98	0,97
W-nositelji (homo)	2		0			(0,55-1,73)	(0,54-1,72)
						P=0,937	P=0,906
C	390		206		0,926		
G	45		22				

Pearsonov  $\chi^2$ -test korišten je za testiranje frekvencija nositelja rijetkog alela i ne-nositelja rijetkog alela između grupa ispitanika MetS(+) i MetS(-). Omjer izgleda (rizika) (OR) određen je logističkom regresijom prije i nakon prilagodbe za dob, spol i hipolipemičku terapiju.

Frekvencije haplotipova *ApoA5* prikazane su u tablici 11. Najfrekventniji haplotip je *ApoA5* -“divlji” (haplotip s tri najzastupljenija alela), *ApoA5-SNP1* i 3 (haplotip s *SNP1* i *SNP3* rijetkim alelima i *S19W* divljim alelom) i *ApoA5 SNP-S19W* (haplotip s *S19W* rijetkim alelima i *SNP1* i *SNP3* učestalim alelima). Rijetki aleli su u tablici označeni podebljanim slovima.

Tablica 11. Frekvencije haplotipova *ApoA5* u obje grupe ispitanika

Haplotip	Frekv. ukupno = 659	<i>S19W</i> (c.56C>G)	<i>SNP1</i> (c.1259T>C)	<i>SNP3</i> (-1132T>C)
<i>Apo A5</i> - “divlji”	80,3 %	C	T	T
<i>Apo A5-SNP 1</i> i 3 rijetki aleli	7,1%	C	<b>C</b>	<b>C</b>
<i>Apo A5 SNP-S19W</i> rijetki aleli	9,0%	<b>G</b>	T	T
<i>Apo A5 SNP1</i> rijetki alel	1,1%	C	<b>C</b>	T
<i>Apo A5 SNP3</i> rijetki alel	1,7%	C	T	<b>C</b>
<i>Apo A5</i> rijetki aleli	0,8%	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>C</b>
<i>Apo A5 SNP1</i> i <i>S19W</i> rijetki aleli	0,2%	<b>G</b>	<b>C</b>	T

Usporedba između podgrupa ne-nositelja i nositelja polimorfizma *S19W* u ispitanika s MetS prikazana je u tablici 12. Značajna razlika je opažena za koncentracije ukupnog kolesterola i triacilglicerola između nositelja i ne-nositelja polimorfizma *S19W*. Koncentracije triacilglicerola više su u cijeloj skupini *W*-nositelja ( $P = 0,050$ ), dok je kolesterol viši samo u muških ispitanika ( $P = 0,048$ ), s malom promjenom značajnosti kada su korigirane s kovarijatama ( $P = 0,035$  i  $P = 0,053$ ). Opaženo je da je rijetki *W19* alel značajno češći u ispitanika s koncentracijama triacilglicerola i ukupnog kolesterola iznad 90-tog percentila, nego u ispitanika s koncentracijama ispod 10-tog percentila.

Tablica 12. *Apo A5 S19W* genotipovi u ispitanika s MetS s visokom (> 90-tog percentila) i niskom (< 10-tog percentila) koncentracijom triacilglicerola i ukupnog kolesterola u serumu

	<i>Apo A5</i> genotip		P- vrijednost*
	<i>S19/S19</i>	<i>W19</i> nositelji	
TG < 10 percentil	21	2	0,035
TG > 90 percentil	14	8	
kolesterol < 10 percentil	21	3	0,049
kolesterol > 90 percentil	14	9	

\*Fisherov egzakti test

Aritmetičke sredine koncentracija ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola značajno su više u ženskih ispitanica koje su nositelji rijetkih *SNP1* i *SNP3* alela (Tablica 13) nego u ženskih ispitanica koje nisu nositeljice ovih alela, nakon provedbe T-testa. Nakon univarijatne analize s prethodno spomenutim setom kovarijata, značajnost se neznatno mijenja i razlike postaju marginalno značajne. U ispitanika bez MetS nema povezanosti koncentracija lipida niti za jedan od istraživanih polimorfizama nakon provedbe T-testa ili univarijatne analize.

Tablica 13. Biokemijski parametri u ispitanika s metaboličkim sindromom kod tri *ApoA5* SNP genotipa

		<i>SI9W</i> polimorfizam, N=229			<i>SNP1</i> polimorfizam, N=221			<i>SNP3</i> polimorfizam, N=222		
		Ne-nositelji, N N-ukupno=184 N-muškarci=82 N-žene=102	19W-nositelji N-ukupno=43 N-muškarci=18 N-žene=25	t-test	Ne-nositelji N-ukupno=179 N-muškarci=77 N-žene=102	Nositelji N-total=42 N-muškarci=20 N-žene=22	t-test	Ne-nositelji N-ukupno=180 N-muškarci=75 N-žene=105	Nositelji N-ukupno=42 N-muškarci=21 N-žene=21	t-test
		Arit.sred.±SD	Arit.sred.±SD	P vrijedn.	Arit.sred.±SD	Arit.sred.±SD	P vrijedn.	Arit.sred.±SD	Arit.sred.±SD	P vrijedn.
Kolesterol (mmol/L)	U	5,39±1,20	5,60±1,22	0,306	5,32±1,17	5,01±1,37	0,178	5,37±1,19	5,65±1,20	0,165
	M	4,97±1,12	5,56±1,17	0,048	5,10±1,16	5,56±1,09	0,765	5,06±1,14	5,07±0,96	0,951
	Ž	5,73±1,18	5,63±1,28	0,727	5,58±1,14	6,23±1,36	0,020	5,59±1,18	6,23±1,16	0,024
HDL-kol. (mmol/L)	U	1,10±0,32	1,06±0,30	0,486	1,10±0,32	1,10±0,32	0,996	1,10±0,32	1,09±0,25	0,962
	M	1,02±0,29	1,04±0,33	0,811	1,05±0,31	0,98±0,23	0,384	1,03±0,31	1,02±0,21	0,988
	Ž	1,16±0,34	1,08±0,27	0,252	1,14±0,32	1,21±0,36	0,320	1,15±0,34	1,16±0,28	0,842
LDL-kol.. (mmol/L)	U	3,45±1,01	3,40±1,45	0,806	3,37±1,12	3,67±1,05	0,912	3,37±1,13	3,70±0,91	0,082
	M	3,18±0,99	3,21±1,87	0,915	3,16±1,26	3,24±0,90	0,774	3,14±1,24	3,26±0,79	0,660
	Ž	3,66±0,98	3,52±1,11	0,550	3,54±0,98	4,05±1,04	0,029	3,53±1,01	4,13±0,81	0,013
Glukoza (mmol/L)	U	7,06±2,26	7,13±3,06	0,896	7,17±2,72	6,87±2,94	0,560	7,18±2,74	6,83±2,84	0,512
	M	7,08±2,72	7,25±3,01	0,972	7,30±2,61	7,30±3,40	0,991	7,38±2,69	7,31±3,10	0,919
	Ž	6,88±2,62	7,05±3,17	0,793	7,05±2,81	6,45±2,42	0,410	7,03±2,78	6,18±2,39	0,281
		Median (IKR)	Median (IKR)	P- vrijedn.	Median (IKR)	Median (IKR)	P- vrijedn.	Median (IKR)	Median (IKR)	P- vrijedn.
Trigliceridi (mmol/L)	U	1,79 (1,16)	1,97 (1,13)	0,050	1,85 (1,15)	1,93 (1,11)	0,703	1,85 (1,10)	1,88 (1,25)	0,912
	M	1,39 (1,80)	1,97 (0,90)	0,174	1,46 (1,23)	1,88 (1,25)	0,851	1,48 (1,14)	1,87 (1,32)	0,870
	Ž	1,96 (0,95)	2,05 (1,35)	0,270	1,96 (0,98)	2,07 (1,05)	0,541	1,96 (0,99)	2,07 (1,03)	0,801

#### 4.7. GENOTIPOVI I FREKVENCije ALELA U GRUPAMA ISPITANIKA MetS(+) i MetS(-) ZA GENSKE VARIJANTE *FABP2*

Pearsonov  $\chi^2$ -test korišten je za testiranje frekvencija nositelja rijetkog alela i ne-nositelja rijetkog alela između grupa ispitanika MetS(+) i MetS(-). Nema razlike u frekvencijama *FABP2 Ala54Thr* genotipova između istraživanih skupina. Frekvencije genotipova za *Ala/Ala*, *Ala/Thr* i *Thr/Thr* su 131, 70 i 13 u grupi MetS(+) te 60, 36 i 6 u MetS(-). Opažene frekvencije genotipova polimorfizama *FABP2* gena bile su u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži u obje grupe ispitanika. *Ala/Ala* genotip je razmatran podgrupom *Thr54* ne-nositelja, dok su genotipovi heterozigota *Ala/Thr* i homozigota *Thr/Thr* razmatrani kao podgrupa *Thr54* nositelja (Tablica 14).

Tablica 14. Genotipovi polimorfizama gena *FABP2*

<i>FABP2</i>	MetS(+) N=214		MetS(-) N=102		P	OR (interval pouzdanosti 95%)
<i>FABP2 54</i> ne-nositelji (N, omjer)	131 (0,69)		60 (0,31)		0,777	1,00 0,91
<i>FABP2 54Thr</i> -nositelji (N, omjer)	83 (0,66)		42 (0,34)			(0,56-1,46) P=0,684
<i>FABP2</i> – alel A (N)	96		48			
<i>FABP2</i> – alel G (N)	332		156			

Frekvencije kategorijalnih varijabli između grupa ispitanika MetS(+) i MetS(-) testirane su Pearsonovim  $\chi^2$ -testom. OR – omjer izgleda (rizika)



#### **4.8. BIOKEMIJSKE I ANTROPOMETRIJSKE VRIJEDNOSTI U ISPITANIKAMA MetS(+) i MetS(-) OBZIROM NA *FABP2 Ala54Thr* POLIMORFIZAM**

Biokemijski i antropometrijski podaci za dvije podgrupe genotipa prikazani su u tablici 15 odvojeno za ispitanike s metaboličkim sindromom i za ispitanike bez metaboličkog sindroma. Opažena je značajna razlika za koncentracije lipida između nositelja i ne-nositelja u MetS(+) ispitanika. Rezultati Mann-Whitney testa pokazali su da su koncentracije triacilglicerola značajno niže ( $P = 0,050$ ) u cijeloj skupini. Prema spolu, značajna razlika je evidentna kod ispitanika ženskog spola ( $P = 0,020$ ). T-testom je utvrđeno da su aritmetičke sredine koncentracija HDL-kolesterola u nositelja Thr-54 značajno više u cijeloj skupini ( $P = 0,001$ ) i za oba spola (u muškaraca  $P = 0,039$ , u žena  $P = 0,004$ ) u usporedbi sThr54-ne-nositeljima. U ispitanika bez metaboličkog sindroma niti za jedan parameter nema razlika između nositelja i ne-nositelja.

Tablica 15. Biokemijske i antropometrijske vrijednosti u ispitanika s i bez metaboličkog sindroma obzirom na *FABP2 Ala54Thr* polimorfizam

		MetS(+) N = 214			MetS(-) N = 102		
		ne-nositelji N-ukupno = 131 N-muškarci= 54 N-žene = 77	<i>54Thr</i> -nositelji N-ukupno=83 N-muškarci=41 N-žene = 42	P	ne-nositelji N-ukupno= 59 N muškarci=24 N-žene = 35	<i>54Thr</i> -nositelji N-ukupno= 43 N- muškarci=21 N-žene = 22	P
Kolesterol mmol L <sup>-1</sup>	Uk.	5,47±1,21	5,38±1,21	0,620	5,50±1,05	5,31±0,93	0,363
	M	5,14±1,14	4,99±1,17	0,524	5,09±1,05	5,01±0,64	0,799
	Ž	5,70±1,21	5,77±1,14	0,753	5,78±0,97	5,60±1,09	0,508
HDL- kolesterol mmol L <sup>-1</sup>	Uk.	1,04±0,31	1,19±0,33	0,001	1,50±0,42	1,48±0,42	0,685
	M	0,98±0,29	1,10±0,29	0,039	1,36±0,47	1,42±0,50	0,688
	Ž	1,06±0,31	1,26±0,34	0,004	1,61±0,35	1,53±0,33	0,378
LDL- kolesterol mmol L <sup>-1</sup>	Uk.	3,45±1,17	3,43±1,03	0,888	3,43±1,07	3,32±0,95	0,606
	M	3,19±1,29	3,17±1,07	0,928	3,15±1,11	3,10±0,81	0,854
	W	3,63±1,05	3,68±0,93	0,783	3,61±1,1	3,54±1,04	0,770
Proteini g L <sup>-1</sup>	Uk.	72,6±5,6	71,5±5,9	0,199	72,2±5,13	71,9±5,31	0,793
	M	73,3±4,8	71,2±5,9	0,094	72,2±6,14	71,6±4,00	0,815
	Ž	72,1±6,2	71,7±6,0	0,743	72,9±4,33	72,2±6,36	0,652
Opseg struka cm	Uk.	103±9	102±11	0,851	93±15	94±20	0,722
	M	106±8	104±11	0,439	100±13	102±24	0,693
	Ž	100±9	100±12	0,989	88±13	86±12	0,605
BMI kg m <sup>-2</sup>	Uk.	29,4±3,4	29,2±3,50	0,720	26,6±3,81	26,6±3,45	0,945
	M	28,8±3,0	28,5±3,0	0,671	26,8±3,50	26,0±2,90	0,462
	Ž	29,8±3,6	29,9±3,8	0,910	26,5±4,06	27,2±3,90	0,512
Aritm. sredina arterijskog krvnog tlaka mmHg	Uk.	107±10	110±12	0,082	110±13	109±12	0,492
	M	108±11	110±14	0,282	106±11	109±12	0,553
	Ž	108±10	111±10	0,165	113±13	109±12	0,221
Glukoza mmol L <sup>-1</sup>	Uk.	6,10 (5,30-7,95)	5,90 (5,40-7,85)	0,724	5,00 (4,63-5,30)	5,00 (4,45- 5,50)	0,925
	M	6,10 (5,40-7,85)	6,10 (5,55-8,80)	0,371	5,00 (4,80-5,30)	4,85 (4,35- 5,38)	0,612
	Ž	6,10 (5,20-8,33)	5,85 (5,23-7,68)	0,675	5,00 (4,60-5,35)	5,05 (4,43- 5,83)	0,614
Triacilglicer ol mmol L <sup>-1</sup>	Uk.	1,96 (1,39-2,48)	1,68 (1,09-2,15)	0,005	1,17 (0,93-1,43)	1,09 (0,82- 1,35)	0,327
	M	1,66 (1,11-2,41)	1,33 (0,97-2,15)	0,144	1,19 (0,99-1,52)	1,05 (0,70- 1,41)	0,179
	Ž	2,05 (1,52-2,59)	1,74 (1,29-2,17)	0,020	1,12 (0,92-1,39)	1,25 (0,88- 1,34)	0,961
CRP g L <sup>-1</sup>	Uk.	2,56 (1,50-5,50)	2,46 (1,47-4,77)	0,405	1,89 (1,12-3,48)	1,79 (1,16- 3,50)	0,952
	M	2,51 (1,86-5,43)	2,27 (1,64-4,17)	0,392	1,50 (0,99-3,52)	1,77 (0,90- 4,08)	0,715
	Ž	2,66 (1,32-5,70)	3,07 (0,88-5,46)	0,753	2,00 (1,12-3,51)	1,79 (1,16- 3,28)	0,842

Uk.-ukupno; M-muškarci; Ž-žene

Učinak genotipova – nositelja 54Thr alela na krvne i antropometrijske parameter proveden je T-testom i analizom kovarijance s dobi i spolom kao kovarijatama. Glukoza, triacilgliceroli i CRP su log-transformirani za testiranje.

#### 4.9. SASTAV I KONCENTRACIJE MASNIH KISELINA U GRUPAMA ISPITANIKA MetS(+) i MetS(-)

Tablica 16. Sastav i koncentracije masnih kiselina u ukupnim lipidima seruma ispitanika s i bez metaboličkog sindroma

Masna kiselina	MetS(+) N = 57		MetS(-) N = 31		P-vrijednost MetS(+)/MetS(-)
	Aritm. sred.	Medijan (IKR)	Aritm. sred.	Medijan (IKR)	
C14 (miristinska kiselina)	765,81	633,87 (423,015)	531,37	477,56 (303,448)	0,044
C16 (palmitinska kiselina)	14120,98	12969,28 (6053,209)	11744,03	11264,45 (4526,942)	0,184
C16:1 (palmitoleinska kiselina)	1162,54	803,64 (568,748)	1080,62	852,75 (745,217)	0,678
C17 (heptadekanoična kiselina)*	3388,93	2500,00 (0,000)	2983,87	2500,00 (0,000)	0,672
C18 (stearinska kiselina)	4419,24	3959,18 (2002,211)	4123,93	4102,98 (1406,477)	0,827
C18:1 (oleinska/elaidična kiselina)	12034,13	9680,55 (8481,113)	9225,54	7251,20 (6219,463)	0,252
C18:2 (linolna kiselina)	10426,17	9000,49 (4533,824)	10376,91	8536,16 (4767,976)	0,958
C18:3 ( $\gamma$ -linolenska kiselina)	5092,82	2749,17 (7954,458)	2659,60	594,98 (4441,105)	0,131
C20 (arahidska kiselina)	30,86	0,00 (0,000)	165,17	0,00 (61,892)	0,442
C20:3 (dihomo- $\gamma$ -linolenska kis.)	999,15	265,61 (957,167)	566,59	246,25 (726,385)	0,600
C22 (behenska kiselina)	172,11	0,00 (0,000)	121,95	0,00 (86,132)	0,417
C20:4 (arahidonska kiselina)	1919,04	1200,07 (2419,680)	1220,47	666,64 (2083,924)	0,295
C22:4 (dokozaetraenska kiselina)	499,17	280,97 (681,289)	346,79	0,00 (425,751)	0,082
C24:1 (nervonska kiselina)	24,04	0,00 (0,000)	300,83	0,00 (0,000)	0,889
C22:6 (dokozaheksaenska kiselina)	181,18	0,00 (103,721)	448,76	0,00 (103,277)	0,787

\*interni standard

Neparametrijski Mann-Whitney test korišten je za usporedbu koncentracija masnih kiselina između dvije skupine ispitanika.

Rezultati Mann-Whitney testa pokazali su statistički značajnu razliku jedino u koncentraciji miristinske kiseline (C14) između grupa ispitanika s i bez metaboličkog sindroma ( $P = 0,044$ ) u ukupnim lipidima seruma.

Koncentracije arahidske (C14), behenske (C22), nervonske (C24:1) i dokozaheksaenske (C22:6) kiseline nisu bile detektabilne u dijelu uzoraka što je u tablici 16. vidljivo iz medijana. Iz tog se razloga navedene masne kiseline ne nalaze u tablicama koje prikazuju povezanost sastava i koncentracija masnih kiselina s genetičkim varijantama *ApoA5* i *FABP2*.

#### 4.10. POVEZANOST SASTAVA I KONCENTRACIJA MASNIH KISELINA S GENSKIM VARIJANTAMA *ApoA5* SNP1 U GRUPI ISPITANIKA MetS+

Tablica 17. Povezanost sastava masnih kiselina i genetičkih varijanti *ApoA5* SNP1 u ispitanika s metaboličkim sindromom

Masna kiselina	<i>SNP1</i> - TT homozigot „divlji tip“ N = 43	<i>SNP1</i> – CT heterozigot N = 11	P-vrijednost
	Medijan (IKR)	Medijan (IKR)	
C14 (miristinska kiselina)	594,49 (436,701)	732,07 (791,51)	0,484
C16 (palmitinska kiselina)	12751,02 (6084,587)	13688,55 (7813,45)	0,307
C16:1 (palmitoleinska kiselina)	790,10 (600,288)	993,57 (480,35)	0,539
C17 (heptadekanoična kiselina)*	2500,00 (0,000)	2500,00 (2500,00)	0,751
C18 (stearinska kiselina)	3776,66 (1814,479)	4665,87 (2245,59)	0,259
C18:1 (oleinska/elaidična kiselina)	9625,93 (7749,806)	11277,29 (8907,10)	0,626
C18:2 (linolna kiselina)	8650,00 (4132,321)	9912,01 (8864,49)	0,582
C18:3 ( $\gamma$ -linolenska kiselina)	2749,17 (6858,279)	1158,83 (10491,24)	0,641
C20:3 (dihomo- $\gamma$ -linolenska kis.)	230,37 (731,457)	265,61 (957,35)	0,539
C20:4 (arahidonska kiselina)	923,06 (2910,181)	558,64 (1322,99)	0,165
C22:4 (dokozaetraenska kiselina)	280,97 (781,551)	165,58 (681,29)	0,983
*interni standard			

Neparametrijski Mann-Whitney test korišten je za usporedbu koncentracija masnih kiselina između dvije skupine ispitanika različitih genotipova *ApoA5* SNP1 s metaboličkim sindromom. Ne postoji statistički značajna razlika u sastavu masnih kiselina između ispitanika s metaboličkim sindromom i različitim genetičkim varijantama *ApoA5* SNP1.

Tablica 18. Povezanost sastava masnih kiselina i genskih varijanti *ApoA5 SNP3* u ispitanika s metaboličkim sindromom

Masna kiselina	<i>SNP3</i> - GG homozigot „divlji tip“ N = 44	<i>SNP3</i> – GT heterozigot N = 12	P-vrijednost
	Medijan (IKR)	Medijan (IKR)	
C14 (miristinska kiselina)	614,18 (381,982)	650,92 (641,336)	0,787
C16 (palmitinska kiselina)	12860,15 (5975,164)	13284,74 (6780,892)	0,454
C16:1 (palmitoleinska kiselina)	796,87 (567,567)	888,60 (518,329)	0,787
C17 (heptadekanoična kiselina)*	2500,00 (0,000)	2500,000 (2500,00)	0,096
C18 (stearinska kiselina)	3801,70 (1839,518)	4704,25 (2156,378)	0,419
C18:1 (oleinska/elaidična kiselina)	9653,24 (7966,273)	10319,84 (8249,534)	0,850
C18:2 (linolna kiselina)	8698,52 (4260,622)	10392,02 (6100,333)	0,639
C18:3 ( $\gamma$ -linolenska kiselina)	3412,96 (6936,195)	867,50 (9170,950)	0,831
C20:3 (dihomo- $\gamma$ -linolenska kis.)	230,03 (809,555)	450,05 (1037,506)	0,315
C20:4 (arahidonska kiselina)	1061,57 (2653,917)	1040,65 (1479,481)	0,352
C22:4 (dokozaetnaenska kiselina)	201,38 (644,380)	663,80 (1033,563)	0,144

Za usporedbu koncentracija masnih kiselina između dvije skupine ispitanika različitih genotipova *ApoA5 SNP3* s metaboličkim sindromom korišten je Mann-Whitney test.

Nije utvrđena statistički značajna razlika u sastavu masnih kiselina između ispitanika s metaboličkim sindromom i različitim genskim varijantama *ApoA5 SNP3*.

Tablica 19. Povezanost sastava masnih kiselina i genskih varijanti *ApoA5 S19W* u ispitanika s metaboličkim sindromom

Masna kiselina	<i>S19W</i> - GG homozigot „divlji tip“ N = 44	<i>S19W</i> – CG heterozigot N = 13	P-vrijednost
	Medijan (IKR)	Medijan (IKR)	
C14 (miristinska kiselina)	509,83 (374,536)	869,56 (626,575)	0,006
C16 (palmitinska kiselina)	12553,58 (5707,473)	14846,46 (6498,103)	0,014
C16:1 (palmitoleinska kiselina)	769,72 (492,547)	1154,46 (1089,266)	0,058
C17 (heptadekanoična kiselina)*	2500,00 (195,517)	2500,00 (0,000)	0,903
C18 (stearinska kiselina)	3680,21 (1925,411)	4731,97 (1843,406)	0,025
C18:1 (oleinska/elaidična kiselina)	9362,61 (8052,495)	13656,62 (9955,110)	0,020
C18:2 (linolna kiselina)	8766,75 (4535,136)	9059,04 (7727,654)	0,341
C18:3 ( $\gamma$ -linolenska kiselina)	3180,66 (8261,180)	903,41 (6701,261)	0,844
C20:3 (dihomo- $\gamma$ -linolenska kis.)	278,80 (809,555)	230,37 (2108,907)	0,829
C20:4 (arahidonska kiselina)	1430,23 (2314,293)	221,47 (923,064)	0,117
C22:4 (dokozatetraenska kiselina)	306,58 (731,420)	119,89 (343,371)	0,381
*interni standard			

Mann-Whitney test je korišten za usporedbu koncentracija masnih kiselina između dvije skupine ispitanika različitih genotipova *ApoA5 S19W* s metaboličkim sindromom.

Statistički značajna razlika u sastavu masnih kiselina između ispitanika s metaboličkim sindromom i različitim genskim varijantama *ApoA5 S19W* postoji za miristinsku (C14), palmitinsku (C16), palmitoleinsku (C16:1), stearinsku (C18) i oleinsku tj. elaidičnu kiselinu (C18:1).



#### 4.11. POVEZANOST SASTAVA MASNIH KISELINA I GENSKIH VARIJANTI *FABP2* U GRUPI ISPITANIKA MetS+

Tablica 20. Povezanost sastava masnih kiselina i genskih varijanti *FABP2* u ispitanika s metaboličkim sindromom

Masna kiselina	<i>FABP2</i> - GG homozigot „divlji tip“ N = 44	<i>FABP2</i> – GA heterozigot N = 13	P-vrijednost
	Medijan (IKR)	Medijan (IKR)	
C14 (miristinska kiselina)	579,59 (469,553)	635,57 (342,974)	0,983
C16 (palmitinska kiselina)	13080,25 (5927,366)	12547,12 (2474,807)	0,533
C16:1 (palmitoleinska kiselina)	879,72 (652,304)	803,64 (327,394)	0,487
C17 (heptadekanoična kiselina)*	2500,00 (0,000)	2500,00 (2500,00)	0,115
C18 (stearinska kiselina)	3801,70 (1877,103)	4266,26 (1800,827)	0,618
C18:1 (oleinska/elaidična kiselina)	10328,00 (8654,772)	9362,82 (4493,955)	0,406
C18:2 (linolna kiselina)	8873,76 (4501,147)	10084,12 (3438,849)	0,561
C18:3 ( $\gamma$ -linolenska kiselina)	1818,20 (8261,180)	5533,16 (7014,110)	0,058
C20:3 (dihomo- $\gamma$ -linolenska kis.)	244,65 (922,409)	356,94 (1313,325)	0,512
C20:4 (arahidonska kiselina)	613,89 (1600,014)	1811,50 (1625,154)	0,013
C22:4 (dokozaetraenska kiselina)	201,38 (659,139)	643,13 (815,243)	0,072

Mann-Whitney test je korišten za usporedbu koncentracija masnih kiselina između dvije skupine ispitanika različitih genotipova *FABP2* s metaboličkim sindromom.

Statistički značajna razlika u sastavu masnih kiselina između ispitanika s metaboličkim sindromom i različitim genskim varijantama *FABP2* postoji za arahidonsku kiselinu (C20:4).

Na granici značajnosti je koncentracija  $\gamma$ -linolenske kiseline (C18:3).

## § 5. RASPRAVA

### 5.1. POLIMORFIZMI JEDNOG NUKLEOTIDA ZA ApoA5

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da nema statistički značajnih razlika u frekvencijama pojedinih genotipova koji uključuju polimorfizme supstitucije jednog nukleotida u genu za ApoA5, odnosno *SNP1*, *SNP3* i *S19W*, između ispitanika s ili bez MetS. Međutim, kada se usporede srednje vrijednosti ili medijani lipidnih parametara uočava se statistički značajna povezanost svih triju polimorfizama s nekim od parametara u ispitanika s metaboličkim sindromom.

Rezultati ovog istraživanja potvrdili su povezanu neravnotežu između polimorfizama ApoA5 *SNP1* i *SNP3*. Dobivena su tri učestala haplotipa (1-ApoA5 koji uključuje sva tri najzastupljenija alela navedenih triju polimorfizama, 2-haplotip koji sadrži divlji *S19W* i rijetke *SNP1* i *SNP3*, te 3-haplotip koji sadrži divlje *SNP1*, *SNP3* i rijetki *S19W* alel) koji se mogu povezati s haplotipovima ApoA5\*1, ApoA5\*2 i ApoA5\*3 koje opisuju Pennacchio i suradnici. Navedeni haplotipovi koji uključuju dodatna dva ApoA5 polimorfizma (*C.-3A>G* i *IVS3+476G>A*) su u snažnoj neravnotežnoj povezanosti s *SNP1* i *SNP3*.<sup>172</sup> Frekvencije triju učestalih haplotipova opažene u starijoj hrvatskoj populaciji iz različitih dijelova Republike Hrvatske (gradskih područja Zagreba, Virovitice, Splita, Omiša i Visa) u našem istraživanju, slična su relativnim frekvencijama utvrđenima u istraživanju provedenom na populaciji bijelaca u Berkeley Lipid Study.<sup>172</sup>

Medijan koncentracija triacilglicerola u obje skupine ispitanika (MetS+ i MetS-), kao i aritmetička sredina koncentracije ukupnog kolesterola u muških ispitanika s MetS statistički su značajno viši u nositelja rijetkog *S19W* alela (*SW* i *WW* genotipovi) nego u nositelja divljeg alela (*SS* genotip). Istovjetni rezultati dobiveni su u istraživanju provedenom u Turskoj, na pacijentima nositeljima rijetkog *S19W* alela s ishemičnim moždanim udarom, koji su imali statistički značajno više koncentracije ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola u serumu.<sup>277</sup> Rezultati istraživanja provedenog u SAD pokazali su da je rijetki alel *S19W* češći u ispitanika s koncentracijama triacilglicerola iznad 90-tog percentila nego li u ispitanika ispod 10-tog percentila. Rezultati ovog istraživanja su također pokazali da je rijetki alel polimorfizma *S19W*

češći u ispitanika s koncentracijama serumskog triacilglicerola iznad 90-tog percentila, ali također i u ispitanika s koncentracijom ukupnog kolesterola iznad 90-tog percentila.

Kod nositelja rijetkih alela *SNP1* i *SNP3* statistički su značajno povišene koncentracije ukupnog kolesterola i LDL-kolesterola u serumu, ali s marginalnom značajnosti nakon korekcije s kovarijatama. Istraživanje provedeno na brazilskim ispitanicima s dislipidemijom pokazalo je da je rijetki *SNP3*-alel „C“ povezan s višim vrijednostima ukupnog kolesterola, kao i koncentracijama triacilglicerola.<sup>278</sup> Manje zastupljeni aleli ista tri polimorfizma *ApoA5-SNP1*, *SNP3* i *S19W* zajedno s *ApoA5* polimorfizmima *SNP2 IVS3+476A* pokazuju značajnu postepeno rastuću povezanost s kvartilima triacilglicerola, ukupnog kolesterola i HDL-kolesterola u serumu mađarskih ispitanika.<sup>279</sup> Kolaborativna analiza 101 istraživanja, pod nazivom Triglyceride Coronary Disease Genetics Consortium and Emerging Risk Factors Collaboration, pokazala je da je *SNP3* značajno povezan s manjom veličinom čestica LDL i HDL.<sup>280</sup> Istraživanje provedeno u Njemačkoj na multietničkoj skupini ispitanika pokazalo je da su određene rijetke mutacije u genu *ApoA5* učestalije u pacijenata s povišenim koncentracijama triacilglicerola no u onima s hiperlipoproteinemijom tipa III.<sup>281</sup>

Sva navedena otkrića rasvjetljavaju ulogu apolipoproteina ApoA5 u regulaciji koncentracije triacilglicerola u serumu. Posljedično, sva stanja povezana s hipertrigliceridemijom i promjenama u drugim lipidnim frakcijama seruma mogla bi biti povezana s genskim polimorfizmima ApoA5.

ApoA5 S19W-aminokiselina se nalazi u signalnom peptidu u blizini mjesta cijepanja, između aminokiselinskih ostataka 23 i 24. Pretpostavlja se da bi polimorfizam *S19W* mogao mijenjati brzinu transporta nezrelog ApoA5 kroz membranu endoplazmatskog retikula, procesa koji se razmatra kao potencijalno odgovoran za ulaz u sekrecijski put.<sup>282</sup>

Suprotno tome, aleli ApoA5 *-1131T/C* i *1259 T/C* nisu funkcionalni aleli i može se konstatirati da bi mogli biti biljezi povezani s drugim funkcionalnim mjestima. Stoga utjecaj najčešćih haplotipova opisanih u literaturi<sup>172</sup> može poslužiti kao objašnjenje za promjene koncentracija lipida u serumu. Istraživanja provedena na životinjama i humanim uzorcima pokazala su da je manjak ApoA5 uzrokovan mutacijama u *ApoA5* genu odgovoran za ozbiljnu hipertrigliceridemiju i da su polimorfizmi jednog nukleotida za ApoA5<sup>166</sup> povezani s hipertrigliceridemijom i kardio-metaboličkim bolestima (kardiovaskularne bolesti, pretilost, šećerna bolest i metabolički sindrom).

## 5.2. POLIMORFIZAM JEDNOG NUKLEOTIDA ZA FABP2

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da nema značajne statističke razlike u frekvenciji *FABP2-Ala54Thr* polimorfizma između ispitanika s i bez metaboličkog sindroma prema kriterijima IDF. U usporedbi s podacima iz literature, uočena je očekivano značajna razlika u lipidnim parametrima između ispitanika. Statistički značajno snižene aritmetičke vrijednosti koncentracija triacilglicerola i više vrijednosti koncentracija HDL-kolesterola u nositelja *54Thr*-alela u usporedbi s nositeljima alela *Ala54* indiciraju moguću protektivnu ulogu *54Thr* alela u ispitanika s metaboličkim sindromom nakon cijelonoćnog posta.<sup>283</sup>

Mnogo je suprotnih zaključaka u istraživanjima koja uključuju polimorfizam *Ala54Thr* i lipidne profile. Snižena koncentracija triacilglicerola u nositelja alela *Thr54* uočena je u 16 zdravih žena u postmenopauzi u istraživanju u kojem su u organizam prehranom unosile hranu bogatu masnoćama.<sup>284</sup> Kod ispitanika muškog i ženskog spola koji su bili uključeni u istraživanje utjecaja prehrane s malim unosom lipida (mediteranska dijeta ili dijeta prema preporukama „American heart association“) uočeno je da kolesterol i fosfolipidi u lipoproteinima bogatim triacilglicerolom kod žena pokazuju najniže, a kod muškaraca najviše vrijednosti u homozigota za alel *Thr54*.<sup>285</sup> Presječno i komparativno istraživanje provedeno u Španjolskoj nije otkrilo razlike u antropometrijskim i lipidnim parametrima između genotipova *Ala54Thr* u ispitanika s ili bez metaboličkog sindroma.<sup>286</sup>

Meta-analiza koja je uključivala istraživanja na različitim populacijama do 2009. godine pokazala je suprotne rezultate za lipidne parametre određivane natašte s obzirom na polimorfizam u genu za *FABP2*<sup>261</sup> a uključivala je ispitanike od 18 godina i starije s različitim zdravstvenim poremećajima. Zaključci nekoliko objavljenih istraživanja provedenih s pretilim ispitanicima su da *Thr54*-alel nije povezan s povišenim koncentracijama triacilglicerola ili nižim koncentracijama HDL-kolesterola natašte. Međutim, općeniti zaključak bio je da je alel *Thr54* povezan s višim koncentracijama triacilglicerola i nižim koncentracijama HDL-kolesterola, što je u suprotnosti rezultatima ovog istraživanja.

*FABP2 Ala54Thr*-polimorfizam može utjecati na koncentracije lipida u serumu ovisno o sastavu hrane unesene u organizam prehranom. Chamberlain i sur. su zaključili da ograničeni unos zasićenih masti u organizam prehranom može biti osobito važan među nositeljima alela *Thr54* u genu za *FABP2* među mladim odraslim osobama dok u lipidnom profilu određivanom natašte nisu pronašli nikakvu razliku.<sup>260</sup> Veliko istraživanje parova provedeno u Japanu pokazalo je da *Thr54* predstavlja rizični čimbenik za infarkt miokarda u ispitanika s

metaboličkim sindromom, iako je bilo povezano sa sniženom glukozom natašte i koncentracijom ukupnog kolesterola.<sup>287</sup>

Očekivalo bi se da polimorfizmi *FABP2* neće utjecati na vrijednosti koncentracija lipida nakon posta obzirom na to da su odgovorni za transport masnih kiselina poslije jela. Međutim literaturni podaci pokazuju različite rezultate ovisno o dizajnu istraživanja, broju ispitanika, dobi, pripadnosti određenoj etničkoj skupini, kliničkim ispitivanjima itd.

### **5.3. POVEZANOST POLIMORFIZAMA *ApoA5* I *FABP2* SA SASTAVOM I KONCENTRACIJAMA MASNIH KISELINA U UKUPNIM LIPIDIMA PLAZME ISPITANIKA**

Sastav masnih kiselina u hrani može značajno utjecati na čimbenike metaboličkog sindroma.<sup>287</sup> Najznačajnije masno-kiselinske komponente lipida u organizam unesenih hranom imaju različit utjecaj na zdravlje,<sup>44, 289</sup> a dijele se na zasićene, trans-nezasićene, mono-nezasićene i polinezasićene masne kiseline. Sastav masnih kiselina u serumu u velikoj je mjeri odraz masti unesenih prehranom,<sup>290</sup> ali i endogene sinteze istih.<sup>289</sup>

Kohortno istraživanje ULSAM (*engl. the Uppsala Longitudinal Study of adult Men*) provedeno u Švedskoj na muškoj populaciji u dobi od 50, te potom 20 godina kasnije u dobi od 70 godina, pokazalo je da je osnovni masno-kiselinski profil u dobi od 50 godina prediktor metaboličkog sindroma 20 godina kasnije. Udjeli miristinske (C14:0), palmitinske (C16:0), palmitoleinske (C16:1), oleinske (C18:1),  $\gamma$ -linolenske (C18:3) i dihomo- $\gamma$ -linolenske kiseline (C20:3) u esterima kolesterola u serumu bili su značajno viši u ispitanika s metaboličkim sindromom, dok je udio linolenske kiseline (C18:2) bio značajno viši u ispitanika bez metaboličkog sindroma u dobi od 70 godina. Udjeli arahidonske kiseline (C20:4) i dokozaheksaenske kiseline (C22:6) se nisu razlikovali između grupa ispitanika. U našem istraživanju koje je također obuhvaćalo stariju populaciju (no oba spola), značajna razlika između ispitanika s i bez metaboličkog sindroma uočena je jedino u koncentraciji miristinske kiseline (C14:0) u ukupnim lipidima seruma, dok ne postoji značajna razlika u koncentracijama palmitinske (C16:0), palmitoleinske (C16:1), stearinske (C18), oleinske/elaidične (C18:1), linolne (C18:2),  $\gamma$ -linolenske (C18:3), arahidske (C20:0), dihomo- $\gamma$ -linolenske (C20:3), behenske (C22:0), arahidonske (C20:4), dokozaetraenske (C22:4), nervonske (C24:1) i dokozaheksaenske (C22:6) kiseline.

U dostupnoj literaturi vrlo je malo objavljenih znanstvenih istraživanja o povezanosti sastava masnih kiselina i apolipoproteina A5, odnosno sastava masnih kiselina i genetičkih varijanti ApoA5. Lai i suradnici u svom su istraživanju pronašli značajnu i konzistentnu interakciju između polimorfizma *ApoA5 -1131T>C* (haplotip *ApoA5\*2*) i unosa polinezasićenih masnih kiselina na koncentraciju triacilglicerola, triacilglicerola ostatnih čestica, kolesterola ostatnih čestica kao i na veličinu VLDL i LDL čestica.<sup>291</sup> Ukoliko je unos polinezasićenih masnih kiselina 6% ili veći u ukupnom unosu energije, nositelji alela *-1131C* pokazuju značajno višu koncentraciju triacilglicerola i ostatnih lipoproteina nakon posta. U usporedbi s TT nositeljima, u nositelja alela *-1131C* veće su čestice VLDL, a manje LDL, što se povezuje s povišenim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti<sup>292</sup>, no povezanost nije značajna za *SNP 56C>G (S19W)* (haplotip *ApoA5\*3*). Povezanost nije utvrđena za ukupne lipide, zasićene masne kiseline i mononezasićene masne kiseline. U istraživanju Domínguez-Reyes i suradnika značajna je povezanost polimorfizma *S19W* i visokog unosa zasićenih masnih kiselina i ukupnih masti s pretilosti, hiperkolesterolemijom i hipertrigliceridemijom.<sup>293</sup>

Rezultati ovog istraživanja ne pokazuju statistički značajnu povezanost genskih varijanti *ApoA5 SNPI* sa sastavom i koncentracijama masnih kiselina u ukupnim lipidima seruma ispitanika s metaboličkim sindromom, kao niti za polimorfizam *ApoA5 SNP3*. Za *SNP S19W* utvrdili smo povezanost koncentracija miristinske kiseline (C14:0), palmitinske (C16:0), stearinske (C18:0) i oleinske/elaidične (C18:1) kiseline, dok je koncentracija palmitoleinske kiseline (C16:1) na granici statističke značajnosti. Prema našim rezultatima, polimorfizam *S19W* u metaboličkom je sindromu povezan sa zasićenim i mononezasićenim masnim kiselinama, ali ne i sa polinezasićenim masnim kiselinama, koje se u literaturi navode kao modulatori gena u metabolizmu lipida<sup>294</sup> što navodi na zaključak da polinezasićene masne kiseline ne moduliraju ApoA5 *S19W* u metabolizmu lipida.

Koncentracije masnih kiselina u ovom istraživanju nisu značajno povezane s genetičkim varijantama FABP2, uz izuzetak arahidonske kiseline (C20:4). Rezultati na granici statističke značajnosti dobiveni su samo za  $\gamma$ -linolensku kiselinu (C18:3). U literaturi se navodi specifična povezanost masnih kiselina s 20 C-atoma i jednim ili dva alela *Thr54*.<sup>295</sup> U drugim pak istraživanjima nije pronađena konzistentna povezanost *Ala54Thr* polimorfizma s koncentracijama masnih kiselina.<sup>296, 297, 298</sup>

*In vitro* istraživanja pokazala su da je FABP2 odgovoran za transport dugolančanih slobodnih masnih kiselina nakon obroka i njihovo razvrstavanje prema sintezi

triacilglicerola.<sup>238</sup> Prekomjerna ekspresija FABP2 u HIEC-6 stanicama pokazala je mali utjecaj na oksidaciju mononezasićenih masnih kiselina. Thr54-izooblik FABP2 je imao veći afinitet vezanja supstrata oleata i arahidonata od Ala54 oblika.<sup>296</sup>

#### 5.4. PREDNOSTI I NEDOSTACI ISTRAŽIVANJA

Vrijednost ovog istraživanja leži u podacima o frekvencijama genotipova apolipoproteina A5 i utjecaju na lipidni status, što se može pokazati korisnim u nastojanjima da se bolje razumije i razjasni patofiziologija metaboličkog sindroma i varijacije u lipidogramima pacijenata, kao i u tome što je ovo prvo provedeno istraživanje ove vrste o utjecaju *FABP2 Ala54Thr* polimorfizma u ispitanika iz Republike Hrvatske.

Ograničenje istraživanja mogao bi biti manjak podataka o koncentracijama lipida nakon obroka, koji bi mogli biti korisni za usporedbu koncentracija triacilglicerola i njihov odnos s postojećim polimorfizmima *APOA5*. Mutacije *APOA5* ekstenzivno su povezane s lipemičnim odgovorom poslije jela.<sup>299</sup>

Ovo istraživanje imalo je određena ograničenja. Istraživanje je uključivalo ispitanike u dobi od 70 godina i starije, a frekvencija metaboličkog sindroma je viša u starijih ispitanika no u mlađih ispitanika. Nadalje, u prethodnim istraživanjima nedostaje podataka što može objasniti dislipidemiju induciranu *Ala54Thr* polimorfizmom. Određivanje sastava slobodnih masnih kiselina i udjela pojedinih slobodnih masnih kiselina mogu biti korisni u rasvjetljavanju povezanosti navedenog polimorfizma s metaboličkim sindromom, budući da različite genetičke varijante pokazuju različiti afinitet za supstrate.<sup>245</sup> Nedostatak podataka o koncentracijama lipida u stanju poslije jela i ispitanicima koji su primali statinsku terapiju oslabljuje naše istraživanje.

Povezanost Thr-kodirajućeg *FABP2* alela s unosom masnih kiselina navodi se za masne kiseline s 14 do 18 C-atoma,<sup>300</sup> što je donekle sukladno našim rezultatima ( $\gamma$ -linolenska kiselina (C18:3) na granici je značajnosti). Naše istraživanje oslabljuje mali broj uzoraka, kao i nedostatak podataka o koncentracijama lipida, te time i masnih kiselina, u stanju poslije jela, obzirom na to da su krvni uzorci ispitanika uzimani natašte. Isto tako, pri analizi plinskom kromatografijom nisu određivane podvrste masnih kiselina.

## § 6. ZAKLJUČCI

1. Hipertenzija, opseg struka, indeks tjelesne mase, koncentracija glukoze natašte, koncentracija HDL-kolesterola i pušenje osnovne su karakteristike ispitanika ovog istraživanja statistički značajno povezane s metaboličkim sindromom.
2. Spol, hipolipemična terapija, koncentracija ukupnog kolesterola i koncentracija LDL-kolesterola nisu statistički značajne za prisustvo metaboličkog sindroma u istraživanoj populaciji, dok je dob na granici značajnosti.
3. Nije utvrđen povećan rizik za razvoj metaboličkog sindroma niti u jednoj od tri genetičke varijante *SNP ApoA5* kod istraživanih skupina.
4. Polimorfizmi gena za ApoA5 mogu biti povezani s koncentracijama lipida u serumu starije populacije s metaboličkim sindromom, no nisu povezani su s koncentracijama lipida u serumu starije populacije koja nema metabolički sindrom. ApoA5 bi se stoga mogao razmotriti čimbenikom u patobiokemiji multifaktorijalnih poremećaja kao što je metabolički sindrom.
5. Genske varijante *FABP2* utječu na koncentracije triacilglicerola i HDL-kolesterola u serumu u starijih ispitanika s metaboličkim sindromom.
6. Nema značajne razlike u frekvenciji *FABP2 Ala54Thr* polimorfizma između ispitanika s i bez metaboličkog sindroma prema kriterijima IDF.
7. Koncentracija miristinske kiseline statistički se značajno razlikuje između ispitanika s i bez metaboličkog sindroma.
8. Polimorfizam *ApoA5 S19W* značajno je povezan s koncentracijama miristinske, palmitinske, stearinske i oleinske/elaidične kiseline, dok je povezanost s koncentracijom palmitoleinske kiseline na granici statističke značajnosti.



9. Rezultati ovog istraživanja navode na zaključak da polinezasićene masne kiseline, koje se u literaturi navode kao modulatori gena u metabolizmu lipida, ne moduliraju gen *ApoA5 S19W* u metabolizmu lipida.
  
10. Koncentracija arahidonske kiseline statistički je značajno povezana s genskim varijantama *FABP2*.

## § 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

**AACE** (*engl. American Association of Clinical Endocrinologists*) – Američko udruženje endokrinologa

**ADMA** (*engl. asymmetric dimethylarginine*) – asimetrični dimetilarginin

**Apo A5 (RAP3)** (*engl. Regeneration-associated protein 3*) - apolipoprotein A5

**APOA5** - gen za apolipoprotein A5

**Apo B** - apolipoprotein B

**Apo C** - apolipoprotein C

**Apo E** - apolipoprotein E

**Akt (PKB)** - *serin/treonin kinaza; protein-kinaza B*

**BMI** (*engl. Body Mass Index*)- indeks tjelesne mase

**bp** (*engl. base pair*) - par baza

**CAD** (*engl. Coronary Artery Disease*) – koronarna bolest arterija

**CD36** (*engl. cluster of differentiation 36*) - skupina diferencijacije 36

**CETP** (*engl. cholesteryl ester transfer protein*) - kolesterol-ester transportni protein

**CRABP** (*engl. cellular retinoic acid-binding proteins*) - proteini koji vežu retinoičnu kiselinu

**CRBPs** (*engl. cellular retinol-binding proteins*) - proteini koji vežu retinol

**CRP** (*engl. C-reactive protein*) - C-reaktivni protein

**CVD** (*engl. Cardiovascular Diseases*) – kardiovaskularne bolesti

**Cyt C** (*engl. Cytochrome C*) – citokrom *c*

**DG** (*engl. diacylglycerols*) - diacilgliceroli

**DMT2** – diabetes mellitus tip 2

**DNA** - deoksiribonukleinska kiselina

**dNTP** - deoksiribonukleotid-trifosfati

**ER** – endoplazmatski retikul

**ET-1** (*engl. endothelin-1*) – endotelin-1

**FA** (*engl. fatty acids*) – masne kiseline

**FABP-2** (*engl. Fatty Acid Binding Protein*) – protein-nosač masnih kiselina 2

**FABP-2** - gen za protein-nosač masnih kiselina 2

**FATP** (*engl. Fatty Acid Transport Protein*) - protein za transport masnih kiselina

- FXR** (*engl. Farnesoid X-activated Receptor*) - farnezoidni X receptor
- GHSR** (*engl. Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a*) - sekretagogni receptor 1a hormona rasta
- GLUT4** - transporter glukoze GLUT4
- HB-EGF** (*engl. heparin-binding endothelial growth factor-like growth factor*) - endotelni faktor rasta koji veže heparin
- HDL** (*engl. High-Density Lipoprotein*) – lipoprotein visoke gustoće
- HDL-C** - HDL-kolesterol
- 11 $\beta$ -HSD1** (*engl. 11  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1*) - 11  $\beta$ -hidroksisteroid-dehidrogenaza tip 1
- HNF4** (*engl. hepatocyte nuclear factor 4*) - hepatocitni nuklearni čimbenik 4
- ICO** (*engl. the indeks of central obesity*) – indeks centralne pretilosti
- IDF** (*engl. International Diabetes Federation*) – Međunarodno udruženje za dijabetes
- IDL** (*engl. Intermediate-Density Lipoprotein*) – lipoprotein srednje gustoće
- IFT** (*engl. impaired fasting glucose*) – poremećena koncentracija glukoze natašte
- IGT** (*engl. impaired glucose tolerance*) – snižena/smanjena tolerancija glukoze
- IL-6** - interleukin-6
- IL-10** - interleukin-10
- LDL** (*engl. Low-Density Lipoprotein*) – lipoprotein niske gustoće
- LPL** (*engl. lipoprotein lipase*) – lipoprotein-lipaza
- IRS-1** (*engl. Insulin receptor substrate 1*) - supstrat za inzulinski receptor 1
- LXR** (*engl. liver X receptor*) - jetreni receptor X
- MAPK** (*engl. mitogen activated protein kinase*) - mitogenom aktivirana protein-kinaza
- MetS** (*engl. Metabolic Syndrome*) - metabolički sindrom
- MG** (*engl. monoacylglycerols*) – monoacilgliceroli
- MTP** (*engl. microsomal triglyceride transport protein*) - mikrosomalni protein za transport triacilglicerola
- NCEP** (*engl. US National Cholesterol Education Program*) – Nacionalni program obrazovanja o kolesterolu u Sjedinjenim Američkim Državama
- Nur77** (NR4A1) – nuklearni receptor 77
- OxLDL** (*engl. Oxidized LDL*) – oksidirani LDL
- PAI-1** (*engl. Plasminogen activator inhibitor-1*) - inhibitor-1 aktivatora plazminogena

- PC-1** (*engl. plasma cell glycoprotein 1*) – glikoprotein-1 plazma stanica
- PCR** (*engl. Polymerase Chain Reaction*) - lančana reakcija polimerazom
- PCTV** (*engl. prechylomicron transport vesicles*) - prehilomikronske transportne vezikule
- PI3K put** (*engl. phosphoinositide 3-kinase pathway*) – put fosfoinozimid-3-kinaze
- PKC put** (*engl. Protein kinase C pathway*) – put protein-kinaze C
- PL** (*engl. phospholipids*) - fosfolipidi
- PON-1** (*engl. paraoxonase 1*) – paraoksonaza-1
- PPAR $\alpha$**  (*engl. Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\alpha$* ) – receptor za aktivator proliferacije peroksisoma  $\alpha$
- ROR** (*engl. retinoid acid receptor - related orphan receptor*) – RAR-srodni orfan receptor
- ROS** (*engl. Reactive Oxygen Species*) – reaktivne vrste kisika
- SNP** (*engl. Single Nucleotide Polymorphism*) – polimorfizam jednog nukleotida
- TAE** - Tris-acetat-EDTA pufer
- TE** - Tris-EDTA pufer
- TG** (*engl. triacylglycerols*) - triacilgliceroli
- TGF- $\beta$**  (*engl. transforming growth factor beta*) -
- TNF $\alpha$**  (*engl. tumor necrosis factor alpha*) - čimbenik nekroze tumora  $\alpha$
- USF1** (*engl. upstream regulatory factor 1*) - uzvodni faktor regulacije 1
- USF2** (*engl. upstream regulatory factor 2*) - uzvodni faktor regulacije 2
- VLDL** (*engl. Very Low-Density Lipoprotein*) – lipoprotein vrlo niske gustoće
- WC** (*engl. – opseg struka*)
- WHO** (*engl. World Health Organization*) – Svjetska zdravstvena organizacija



## § 8. LITERATURNI IZVORI

1. E. Kylin, Studies of the hypertension-hyperglycemia-hyperuricemia syndrome (Studien ueber das hypertonie-hypergly-kämie-hyperurikämiesyndrom.) *Zentralblatt fuer Innere Medizin.* **44** (1923) 105–127.
2. J. Vague, Sexual differentiation. A factor affecting the forms of obesity. *Presse Medicale.* **30** (1947) S39–S40.
3. G. M. Reaven, Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* **37** (1988) 1595-1607.
4. N. M. Kaplan, The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch. Intern. Med.* **149**(7) (1989) 1514-1520.
5. S. M. Haffner, R. A. Valdez, H. P. Hazuda, B. D. Mitchell, P. A. Morales i M. P. Stern, Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes.* **41**(6) (1992) 715-722.
6. R. H. Eckel, S. M. Grundy i P. Z. Zimmet, The metabolic syndrome. *Lancet.* **365**(9468) (2005) 1415-1428.
7. J. A. Kaur, Comprehensive Review on Metabolic Syndrome, *Cardiology Research and Practice.* **2014** (2014) Article ID 943162, 21 pages, doi:10.1155/2014/943162
8. K. G. Alberti i P. Z Zimmet, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* **15**(7) (1998) 539-553.
9. B. Balkau i M. A. Charles, Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) *Diabet. Med.* **16**(5) (1999) 442-443.
10. J. I. Cleeman, 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**(19) (2001) 2486-2497.

11. D. Einhorn, G. M. Reaven, R. H. Cobin, E. Ford, O. P. Ganda, Y. Handelsman, R. Hellman, P. S. Jellinger, D. Kendall, R. M. Krauss, N. D. Neufeld, S. M. Petak, H. W. Rodbard, J. A. Seibel, D. A. Smith, i P. W. Wilson, American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocr. Pract.* **9**(3) (2003) 237-252.
12. International Diabetes Federation: The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome, 2005, <http://www.idf.org/metabolic-syndrome> (preuzeto 8. travnja 2016. u 23:16h)
13. R. M. Parikh i V. Mohan, Changing definitions of metabolic syndrome. *Indian. J. Endocrinol. Metab.* **16**(1) (2012) 7-12.
14. [https://www.idf.org/webdata/docs/MetS\\_def\\_update2006.pdf](https://www.idf.org/webdata/docs/MetS_def_update2006.pdf) (preuzeto 9. travnja 2016. u 11:34h)
15. R. M. Parikh, S. R. Joshi, P. S. Menon i N. S. Shah, Index of central obesity - A novel parameter. *Med. Hypotheses.* **68**(6) (2007) 1272-1275.
16. S. Desroches i B. Lamarche, The evolving definitions and increasing prevalence of the metabolic syndrome. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **32**(1) (2007) 23-32.
17. G. D. Kolovou, K. K. Anagnostopoulou, K. D. Salpea i D. P. Mikhailidis, The prevalence of metabolic syndrome in various populations. *Am. J. Med. Sci.* **333**(6) (2007) 362-371.
18. A. J. Cameron, J. E. Shaw i P. Z. Zimmet, The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* **33**(2) (2004) 351-375.
19. Y. W. Park, S. Zhu, L. Palaniappan, S. Heshka, M. R. Carnethon i S. B. Heymsfield, The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch. Intern. Med.* **163**(4) (2003) 427-436.
20. E. S. Ford, W. H. Giles i W. H. Dietz, Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA.* **287**(3) (2002) 356-359.
21. A. Ponholzer, C. Temml, M. Rauchenwald, M. Marszalek i S. Madersbacher, Is the metabolic syndrome a risk factor for female sexual dysfunction in sexually active women? *Int. J. Impot. Res.* **20**(1) (2008) 100-104.

22. P. W. F. Wilson, W. B. Kannel, H. Silbershatz i R. B. D'Agostino, Clustering of metabolic factors and coronary heart disease. *Arch. Intern. Med.* **159**(10) (1999) 1104-1109.
23. L. Palaniappan, M. R. Carnethon, Y. Wang, A. J. Hanley, S. P. Fortmann, S. M. Haffner i L. Wagenknecht, Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Predictors of the incident metabolic syndrome in adults: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care.* **27**(3) (2004) 788-793.
24. M. P. Reilly i D. J. Rader, The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation.* **108**(13) (2003) 1546-1551.
25. E. A. Andreadis, G. I. Tsourous, C. K. Tzavara, D. X. Georgiopoulos, P. M., Katsanou, G. E. Marakomichelakis i E. J. Diamantopoulos, Metabolic syndrome and incident cardiovascular morbidity and mortality in a Mediterranean hypertensive population. *Am. J. Hypertens.* **20**(5) (2007) 558-564.
26. T. Poljicanin, M. Sekerija, J. Boras, S. Canecki-Varzić, Z. Metelko, J. Kern i S. Vuletić, Metabolic syndrome--community nursing evaluation and intervention: the CroHort study. *Coll. Antropol.* **36**(1) (2012) 35-40.
27. S. Tucak-Zorić, I. B. Curčić, H. Mihalj, I. Dumancić, Z. Zelić, N. M. Cetina, R. Smolić, M. Volarević, S. Missoni, A. Tomljenović, L. Szivoczka, Z. Duraković, H. Xi, R. Chakraborty, R. Deka, A. Tucak i P. Rudan, Prevalence of metabolic syndrome in the interior of Croatia: the Baranja region. *Coll Antropol.* **32**(3) (2008) 659-665.
28. R. Deka, N. S. Naranić, H. Xip, S. Turek, M. Cubrilo-Turek, D. Vrhovski-Hebrang, Janićijević, B., Tomljenović, A., Szivoczka, L., Jin, L., Chakraborty. R. i P. Rudan Metabolic syndrome in an island population of the eastern Adriatic coast of Croatia. *Coll. Antropol.* **32**(1) (2008) 85-91.
29. I. Kolčić, A. Vorko-Jović, B. Salzer, M. Smoljanović, J. Kern i S. Vuletić, Metabolic Syndrome in a Metapopulation of Croatian Island Isolates *Croat. Med. J.* **47**(4) (2006) 585-592.
30. D. Pašalić, S. Dodig, N. Čorović, A. Pizent, J. Jurasović i M. Pavlović, High prevalence of metabolic syndrome in an elderly Croatian population—a multicentre study. *Public Health Nutr.* **14**(09) (2011) 1650-1657.



31. K. Srikanthan, A. Feyh, H. Visweshwar, J. I. Shapiro i K. Sodhi, Systematic Review of Metabolic Syndrome Biomarkers: A Panel for Early Detection, Management, and Risk Stratification in the West Virginian Population. *Int. J. Med. Sci.* **13**(1) (2016) 25–38.
32. N. Halberg, I. Wernstedt-Asterholm i P. E. Scherer, The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* **37**(3) (2008) 753-768.
33. S. Cinti, G. Mitchell, G. Barbatelli, I. Murano, E. Ceresi, E. Faloia, S. Wang, M. Fortier, A. S. Greenberg i M. S. Obin, Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid. Res.* **46**(11) (2005) 2347-2355.
34. P. Trayhurn i I. S. Wood, Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.* **92**(3) (2004) 347-355.
35. U. Saleem, M. Khaleghi, N. G. Morgenthaler, A. Bergmann, J. Struck, T.H. Jr. Mosley i I. J. Kullo, Plasma carboxy-terminal provasopressin (copeptin): a novel marker of insulin resistance and metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**(7) (2009) 2558-2564.
36. S. Tsimikas, J. Willet, M. Knoflach, M. Mayr, G. Egger, M. Notdurfter, J. L. Witztum, C. J. Wiedermann, Q. Xu i S. Kiechl, Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, ferritin levels, metabolic syndrome, and 10-year cardiovascular and non-cardiovascular mortality: results from the Bruneck study. *Eur. Heart J.* **30**(1) (2009) 107-115.
37. M. Jacobs, M. M. J. van Greevenbroek, C. J. van der Kallen, I. Ferreira, E. E. Blaak, E. J. Feskens, C. G. Schalkwijk i C. D. A. Stehouwer, Low-grade inflammation can partly explain the association between the metabolic syndrome and either coronary artery disease or severity of peripheral arterial disease: the CODAM study. *Eur. J. Clin. Invest.* **39** (2009) 437-444.
38. J. M. Miles i M. D. Jensen, Counterpoint: visceral adiposity is not causally related to insulin resistance. *Diabetes Care.* **28**(9) (2005) 2326-2328.
39. G. Boden, B. Lebed, M. Schatz, C. Homko i S. Lemieux, Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects. *Diabetes.* **50**(7) (2001) 1612-1617.

40. S. E. Kahn, R. L. Prigeon, R. S. Schwartz, W. Y. Fujimoto, R. H. Knopp, J. D. Brunzell i D. Jr. Porte, Obesity, body fat distribution, insulin sensitivity and Islet beta-cell function as explanations for metabolic diversity. *J. Nutr.* **131**(2) (2001) 354S-360S.
41. D. M. Bravata, C. K. Wells, J. Concato, W. N. Kernan, L. M. Brass i B. I. Gulanski, Two measures of insulin sensitivity provided similar information in a U.S. population. *J. Clin. Epidemiol.* **57**(11) (2004) 1214-1217.
42. D. G. Carey, A. B. Jenkins, L. V. Campbell, J. Freund i D. J. Chisholm, Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women: Direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM. *Diabetes.* **45**(5) (1996) 633-638.
43. E. J. Mayer-Davis, R. Jr. D'Agostino, A. J. Karter, S. M. Haffner, M. J. Rewers, M. Saad i R. N. Bergman, Intensity and amount of physical activity in relation to insulin sensitivity: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *JAMA.* **279**(9) (1998) 669-674.
44. B. Vessby, M. Uusitupa, K. Hermansen, G. Riccardi, A. A. Rivellese, L. C. Tapsell, C. Näslén, L. Berglund, A. Louheranta, B. M. Rasmussen, G. D. Calvert, A. Maffetone, E. Pedersen, I. B. Gustafsson, L. H. Storlien i KANWU Study. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia.* **44**(3) (2001) 312-319.
45. H. Gill, M. Mugo, A. Whaley-Connell, C. Stump i J. R. Sowers, The key role of insulin resistance in the cardiometabolic syndrome. *Am. J. Med. Sci.* **330**(6) (2005) 290-294.
46. K. F. Petersen i G. I. Shulman, Etiology of insulin resistance. *Am. J. Med.* **119**(5 Suppl 1) (2006) S10-S16.
47. <http://www.shutterstock.com> (preuzeto 20. travnja 2016 u 11.50 h)
48. Ž. Metelko i N. Crkvenčić, Sindrom metaboličke inzulinske rezistencije i metabolizam ugljikohidrata. *Medicus.* **13**(2) (2004) 41-49.
49. M. D. Jensen, M. W. Haymond, R. A. Rizza, P. E. Cryer i J. M. Miles, Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *J. Clin. Invest.* **83**(4) (1989) 1168-1173.

50. Q. Yu, F. Gao i X. L. Ma, Insulin says NO to cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* **89**(3) (2011) 516-524.
51. G. F. Lewis i G. Steiner, Acute effects of insulin in the control of VLDL production in humans. Implications for the insulin-resistant state. *Diabetes Care.* **19**(4) (1996) 390-393.
52. H. N. Ginsberg, Y. L. Zhang i A. Hernandez-Ono, Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch. Med. Res.* **36**(3) (2005) 232-240.
53. E. Ferrannini i A. Natali, Essential hypertension, metabolic disorders, and insulin resistance. *Am. Heart J.* **121**(4 Pt 2) (1991) 1274-1282.
54. A. Malhotra, B. P. S. Kang, S. Cheung, D. Opawumi i L.G. Meggs, Angiotensin II promotes glucose-induced activation of cardiac protein kinase C isozymes and phosphorylation of troponin I. *Diabetes.* **50**(8) (2001) 1918-1926.
55. S. A. Morse, R. Zhang, V. Thakur and E. Reisin, Hypertension and the metabolic syndrome. *Am. J. Med. Sci.* **330**(6) (2005) 303-310.
56. A. M. Briones, A. N. D. Cat, G. E. Callera, A. Yogi, D. Burger, Y. He, J. W. Corrêa, A. M. Gagnon, C. E. Gomez-Sanchez, E. P. Gomez-Sanchez, A. Sorisky, T. C. Ooi, M. Ruzicka, K. D. Burns i R. M. Touyz, Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways: implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction. *Hypertension.* **59**(5) (2012) 1069-1078.
57. A. Aljada, P. Mohanty, H. Ghanim, T. Abdo, D. Tripathy, A. Chaudhuri i P. Dandona Increase in intranuclear nuclear factor kappaB and decrease in inhibitor kappaB in mononuclear cells after a mixed meal: evidence for a proinflammatory effect. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**(4) (2004) 682-690.
58. P. Dandona, A. Aljada, A. Chaudhuri, P. Mohanty i R. Garg, Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation.* **111**(11) (2005) 1448-1454.
59. R. G. Thaman i G. P. Arora, Metabolic Syndrome: Definition and Pathophysiology – the discussion goes on! *J. Phis. Pharm. Adv.* **3**(3) (2013) 48-56.
60. J. M. Ordovas, Genetic links between diabetes mellitus and coronary atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **9**(3) (2007) 204-210.

61. M. Laakso, Gene variants, insulin resistance, and dyslipidaemia. *Curr. Opin. Lipidol.* **15**(2) (2004) 115-120.
62. P. Poulsen, K. Levin, I. Petersen, K. Christensen, H. Beck-Nielsen i A. Vaag, Heritability of insulin secretion, peripheral and hepatic insulin action, and intracellular glucose partitioning in young and old Danish twins. *Diabetes.* **54**(1) (2005) 275-283.
63. J. V. Neel, Diabetes mellitus: A “Thrifty” Genotype Rendered Detrimental by “Progress”? *Am. J. Hum. Genet.* **14**(4) (1962) 353–362.
64. J. R. Speakman, Thrifty genes for obesity and the metabolic syndrome--time to call off the search? *Diab. Vasc. Dis. Res.* **3**(1) (2006) 7-11.
65. L. Groop, Genetics of the metabolic syndrome. *Br. J. Nutr.* **83** (Suppl 1) (2000) S39-S48.
66. C. N. Hales i D. J. P. Baker, Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* **35**(7) (1992) 595-601.
67. C. N. Hales, M. Desai i S. E. Ozanne, The Thrifty Phenotype hypothesis: how does it look after 5 years? *Diabet Med.* **14**(3) (1997) 189-195.
68. C. M. Povel, J. M. A. Boer, E. Reiling, E. J. M. Feskens Genetic variants and the metabolic syndrome: a systematic review, *Obes. Rev.* **12**(11) (2011) 952-967.
69. K. Bengtsson, O. Melander, M. Orho-Melander, U. Lindblad, J. Ranstam, L. Råstam i L. Groop, Polymorphism in the beta(1)-adrenergic receptor gene and hypertension. *Circulation.* **104**(2) (2001) 187-190.
70. Q. Song, S. S. Wang i M. Zafari, Genetics of metabolic syndrome, *Hospital Physician.* **42** (2006) 51-61.
71. G. K. Hansson, Mechanisms of disease: inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* **352**(16) (2005) 1685-1695.
72. <http://www.shutterstock.com> (preuzeto 21. travnja 2016 u 16.10 h)
73. D. G. Harrison, Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J. Clin. Invest.* **100**(9) (1997) 2153-2157.
74. D. Čvorišćec, i I. Čepelak (ur.), *Štrausova medicinska biokemija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2009, str. 420-421.
75. R. Deepa, K. Velmurugan, K. Arvind, P. Sivaram, C. Sientay, S. Uday i V. Mohan, Serum levels of interleukin 6, C-reactive protein, vascular cell adhesion molecule 1,

- and monocyte chemotactic protein 1 in relation to insulin resistance and glucose intolerance--the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES). *Metabolism*. **55**(9) (2006) 1232-1238.
76. A. Soto González, D. Bellido Guerrero, M. Buno Soto, S. Pertega Diaz, M. Martinez-Olmos i O. Vidal, Metabolic syndrome, insulin resistance and the inflammation markers C-reactive protein and ferritin. *Eur. J. Clin. Nutr.* **60** (2006) 802–809.
77. S. Guldiken, M. Demir, E. Arikan, B. Turgut, S. Azcan, M. Gerenli i A. Tugrul, The levels of circulating markers of atherosclerosis and inflammation in subjects with different degrees of body mass index: Soluble CD40 ligand and high-sensitivity C-reactive protein. *Thromb Res.* **119**(1) (2007) 79-84.
78. T. McLaughlin, F. Abbasi, C. Lamendola, L. Liang, G. Reaven, P. Schaaf i P. Reaven, Differentiation between obesity and insulin resistance in the association with C-reactive protein. *Circulation*. **106**(23) (2002), 2908-2912.
79. <http://www.shutterstock.com> (preuzeto 20. travnja 2016 u 11.50 h)
80. P. M. Ridker, J. E. Buring, N. R. Cook i N. Rifai, C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation*. **107**(3) (2003) 391-397.
81. K. Safranow, V. Dziedziejko, R. Rzeuski, E. Czyżycka, H. Bukowska, A. Wojtarowicz, A. Bińczak-Kuleta, K. Jakubowska, M. Olszewska, A. Ciechanowicz, Z. Kornacewicz-Jach, B. Machaliński, A. Pawlik i D. Chlubek, Inflammation markers are associated with metabolic syndrome and ventricular arrhythmia in patients with coronary artery disease. *Postepy. Hig. Med. Dosw. (Online)*. **70**(0) (2016) 56-66.
82. M. B. Clearfield, C-reactive protein: a new risk assessment tool for cardiovascular disease. *J. Am. Osteopath. Assoc.* **105**(9) (2005) 409-416.
83. S. M. Grundy, Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**(6) (2004) 2595-2600.
84. M. Liu i F. Liu, Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. *Biochem J.* **425**(1) (2009) 41-52.
85. Y. Matsuzawa, T. Funahashi, S. Kihara i I. Shimomura, Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**(1) (2004) 29-33.

86. T. Kazumi, A. Kawaguchi, K. Sakai, T. Hirano i G. Yoshino, Young men with high-normal blood pressure have lower serum adiponectin, smaller LDL size, and higher elevated heart rate than those with optimal blood pressure. *Diabetes Care*. **25**(6) (2002) 971-976.
87. T. Pischon, C. J. Girman, G. S. Hotamisligil, N. Rifai, F. B. Hu i E. B. Rimm, Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA*. **291**(14) (2004) 1730-1737.
88. A. M. Xydakis, C. C. Case, P. H. Jones, R. C. Hoogeveen, M. Y., Liu, E. O. Smith, K. W. Nelson i C. M. Ballantyne, Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**(6) (2004) 2697-2703.
89. H. S. Lee, M. Lee i H. Joung, Adiponectin represents an independent risk factor for hypertension in middle aged Korean women. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **16**(1) (2007) 10-15.
90. N. Maeda, M. Takahashi, T. Funahashi, S. Kihara, H. Nishizawa, K. Kishida, H. Nagaretani, M. Matsuda, R. Komuro, N. Ouchi, H. Kuriyama, K. Hotta, T. Nakamura, I. Shimomura i Y. Matsuzawa, PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*. **50**(9) (2001) 2094-2099.
91. M. Fasshauer, S. Kralisch, M. Klier, U. Lossner, M. Bluher, J. Klein i R. Paschke, Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**(4) (2003) 1045-1050.
92. M. Ryo, T. Nakamura, S. Kihara, M. Kumada, S. Shibazaki, M. Takahashi, M. Nagai, Y. Matsuzawa i T. Funahashi, Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ. J.* **68**(11) (2004) 975-981.
93. D. C. W. Lau, B. Dhillon, H. Yan, P. E. Szmitko i S. Verma, Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **288**(5) (2005) H2031-H2041.
94. L. Hutley i J. B. Prins, Fat as endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome. *Am. J. Med. Sci.* **330**(6) (2005) 280-289.

95. M. Carlyle, O. B. Jones, J. J. Kuo i J. E. Hall, Chronic cardiovascular and renal actions of leptin: role of adrenergic activity. *Hypertension*. **39**(2 Pt 2) (2002) 496-501.
96. <http://www.shutterstock.com> (preuzeto 20. travnja 2016 u 11.50 h)
97. R. V. Considine, M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, C. C. Marco, L. J. McKee, T. L. Bauer i J. F. Caro, Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* **334**(5) (1996) 292-295.
98. K. Stenlöf, I. Wernstedt, T. Fjällman, V. Wallenius, K. Wallenius i J.O. Jansson, Interleukin-6 levels in the central nervous system are negatively correlated with fat mass in overweight/obese subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**(9) (2003) 4379-4383.
99. B.K. Pedersen, A. Steensberg, C. Fischer, C. Keller, P. Keller, P. Plomgaard, M. Febbraio i B. Saltin, Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J. Muscle. Res. Cell. Motil.* **24**(2-3) (2003) 113-119.
100. M. Diamant, H. J. Lamb, M. A. van de Ree, E. L. Endert, Y. Groeneveld, M.L. Bots, P. J. Kostense i J. K. Radder, The association between abdominal visceral fat and carotid stiffness is mediated by circulating inflammatory markers in uncomplicated type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**(3) (2005) 1495-1501.
101. A. V. Capelo, V. M. da Fonseca, M. V. Peixoto, S. R. de Carvalho, C. M. Azevedo, M. I. Elsas i B. Marques, Visceral adiposity is associated with cytokines and decrease in lung function in women with persistent asthma. *Rev. Port. Pneumol.* (2006). **22**(5) (2016) 255-261.
102. A. D. Pradhan, J. E. Manson, N. Rifai, J. E. Buring i P. M. Ridker, C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. **286**(3) (2001) 327-334.
103. G. Zuliani, S. Volpato, A. Blè, S. Bandinelli, A. M. Corsi, F. Lauretani, G. Paolisso, R. Fellin i L. Ferrucci, High interleukin-6 plasma levels are associated with low HDL-C levels in community-dwelling older adults: The InChianti study. *Atherosclerosis*. **192**(2) (2007) 384-390.
104. M. J. Hosseinzadeh-Attar, A. Golpaie, M. Foroughi, F. Hosseinpanah, S. Zahediasl i F. Azizi, The relationship between visfatin and serum concentrations of

- C-reactive protein, interleukin 6 in patients with metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest.* **39**(8) (2016) 917-922.
105. A. R. Aroor, S. McKarns, V. G. Demarco, G. Jia i J. R. Sowers, Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. *Metabolism.* **62**(11) (2013) 1543-1552.
106. H. J. Kim, T. Higashimori, S. Y. Park, H. Choi, J. Dong, Y. J. Kim, H. L. Noh, Y. R. Cho, G. Cline, Y. B. Kim i J. K. Kim, Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action *in vivo*. *Diabetes.* **53** (2004) 1060–1067.
107. E. van Exel, J. Gussekloo, A. J. de Craen, M. Frolich, A. Bootsma-Van Der Wiel, R. G. Westendorp i Leiden 85 Plus Study. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes.* **51** (2002) 1088–1092.
108. K. Esposito, A. Pontillo, F. Giugliano, G. Giugliano, R. Marfella, G. Nicoletti i D. Giugliano, Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**(3) (2003) 1055-1058.
109. K. M. Choi, O. H. Ryu, K. W. Lee, H. Y. Kim, J. A. Seo, S. G. Kim, N. H. Kim, D. S. Choi i S. H. Baik, Serum adiponectin, interleukin-10 levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **75**(2) (2007) 235-240.
110. L. X. Chen, S. D. Zhang, L. L. Zhu i M. Sun, Association of metabolic syndrome with serum interleukin-10 and high sensitive C reactive protein (hs-CRP) in old men. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban = Journal of Central South University Medical sciences.* **33**(10) (2008) 970-974.
111. A. T. Kraja, M. A. Province, D. Arnett, L. Wagenknecht, W. Tang, P. N. Hopkins, L. Djoussé i I. B. Borecki, Do inflammation and procoagulation biomarkers contribute to the metabolic syndrome cluster? *Nutr. Metab. (Lond).* **4** (2007) 28.
112. F. Paganelli, M. C. Alessi, P. Morange, J. M. Maixent, S. Levy i I. J. Vague, Relationship of plasminogen activator inhibitor-1 levels following thrombolytic therapy with rt-PA as compared to streptokinase and patency of infarct related coronary artery. *Thrombosis and haemostasis.* **82** (1999) 104–108.



113. E. K. Kruithof, A. Gudinchet i F. Bachmann, Plasminogen activator inhibitor 1 and plasminogen activator inhibitor 2 in various disease states. *Thrombosis and haemostasis*. **59** (1988) 7–12.
114. I. Juhan-Vague, M. C. Alessi, A. Mavri i P. E. Morange, Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk. *J. Thromb. Haemost.* **1** (2003) 1575–1579.
115. S. Bilgili, A. C. Celebiler, A. Dogan i B. Karaca, Inverse relationship between adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 in metabolic syndrome patients. *Endocr. regul.* **42** (2008) 63–68.
116. P. Wainwright i C. D. Byrne, Bidirectional Relationships and Disconnects between NAFLD and Features of the Metabolic Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* **17**(3) (2016) 367.
117. B. R. Binder, G. Christ, F. Gruber, N. Grubic, P. Hufnagl, M. Krebs, J. Mihaly i G.W. Prager, Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. *News Physiol. Sci.* **17** (2002) 56-61.
118. A. R. Folsom, H. T. Qamhieh, R. R. Wing, R. W. Jeffery, V. L. Stinson, L. H. Kuller i K. K. Wu, Impact of weight loss on plasminogen activator inhibitor (PAI-1), factor VII, and other hemostatic factors in moderately overweight adults. *Arterioscler. Thromb.* **13**(2) (1993) 162-169.
119. M. Cigolini, G. Targher, I. A. B. Andreis, M. Tonoli, G. Agostino i G. De Sandre, Visceral fat accumulation and its relation to plasma hemostatic factors in healthy men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**(3) (1996) 368-374.
120. H. P. Kohler i P. J. Grant, Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* **342**(24) (2000) 1792-1801.
121. K. Musialik, The influence of chosen adipocytokines on blood pressure values in patients with metabolic syndrome. *Kardiol. Pol.* **70**(12) (2012) 1237-1242.
122. <http://www.shutterstock.com> (preuzeto 20. travnja 2016 u 11.50 h)
123. M. Bălăşoiu, A. T. Bălăşoiu, A. E. Stepan, S. N. Dinescu, C. S. Avramescu, D. Dumitrescu, D. Cernea i D. Alexandru, Proatherogenic adipocytokines levels in metabolic syndrome. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **55**(1) (2014) 29-33.

124. H. Ruan i H. F. Lodish, Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Cytokine Growth Factor Rev.* **14** (2003) 447-455.
125. S. Gormez, A. Demirkan, F. Atalar, B. Caynak, R. Erdim, V. Sozer, D. Gunay, B. Akpınar, U. Ozbek i A. S. Buyukdevrim, Adipose tissue gene expression of adiponectin, tumor necrosis factor- $\alpha$  and leptin in metabolic syndrome patients with coronary artery disease. *Intern. Med.* **50**(8) (2011) 805-810.
126. K. Indulekha, J. Surendar i V. Mohan, High sensitivity C-reactive protein, tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6, and vascular cell adhesion molecule-1 levels in Asian Indians with metabolic syndrome and insulin resistance (CURES-105). *J. Diabetes. Sci. Technol.* **5**(4) (2011) 982-988.
127. W. N. Cong, E. Golden, N. Pantaleo, C. M. White, S. Maudsley i B. Martin, Ghrelin receptor signaling: a promising therapeutic target for metabolic syndrome and cognitive dysfunction. *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets.* **9**(5) (2010) 557-563.
128. L. Varela, M. J. Vazquez, F. Cordido, R. Nogueiras, A. Vidal-Puig, C. Dieguez i M. López, Ghrelin and lipid metabolism: key partners in energy balance. *J. Mol. Endocrinol.* **46**(2) (2011) R43-R63.
129. M. Tesouro, F. Schinzari, V. Rovella, N. Di Daniele, D. Lauro, N. Mores, A. Veneziani i C. Cardillo, Ghrelin restores the endothelin 1/nitric oxide balance in patients with obesity-related metabolic syndrome. *Hypertension.* **54** (2009) 995–1000.
130. L. Pulkkinen, O. Ukkola, M. Kolehmainen i M. Uusitupa, Ghrelin in diabetes and metabolic syndrome. *Int. J. Pept.* (2010) pii: 248948. doi: 10.1155/2010/248948
131. O. Ukkola, S. M. Poykko i Y. Antero Kesaniemi, Low plasma ghrelin concentration is an indicator of the metabolic syndrome. *Ann. Med.* (2006) **38**(4) 274-279.
132. M. Tschop, C. Weyer, P. A. Tataranni, V. Devanarayan, E. Ravussin i M. L. Heiman, Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes.* **50** (2001) 707–709.

133. F. Bacha i S. A. Arslanian, Ghrelin suppression in overweight children: a manifestation of insulin resistance? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**(5) (2005) 2725–2730.
134. B. Fagerberg, L. M. Hulthen i J. Hulthe, Plasma ghrelin, body fat, insulin resistance, and smoking in clinically healthy men: the atherosclerosis and insulin resistance study. *Metabolism.* **52**(11) (2003) 1460-1463.
135. T. McLaughlin, F. Abbasi, C. Lamendola, R. S. Frayo i D. E. Cummings, Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistant obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**(4) (2004) 1630-1635.
136. D. H. St-Pierre, A. D. Karelis, L. Coderre, F. Malita, J. Fontaine, D. Mignault, M. Brochu, J. P. Bastard, K. Cianflone, E. Doucet, P. Imbeault i R. Rabasa-Lhoret, Association of acylated and nonacylated ghrelin with insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**(1) (2007) 264-269.
137. <http://www.shutterstock.com> (preuzeto 20. travnja 2016 u 11.50 h)
138. L. Billiet, S. Doaty, J. D. Katz i M. T. Velasquez, Review of hyperuricemia as new marker for metabolic syndrome. *ISRN Rheumatol.* (2014) 2014:852954. doi: 10.1155/2014/852954
139. F. C. McGillicuddy, M. de la Llera Moya, C. C. Hinkle, M. R. Joshi, E. H. Chiquoine, J. T. Billheimer, G. H. Rothblat i M. P. Reilly, Inflammation impairs reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation.* **119** (2009) 1135–1145.
140. R. K. Murray, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, V. W. Rodwell i P. A. Weil, *Harperova ilustrirana biokemija*, 28. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2011, str. 631.
141. N. Ishizaka, Y. Ishizaka, E. Toda, R. Nagai i M. Yamakado, Association between serum uric acid, metabolic syndrome, and carotid atherosclerosis in Japanese individuals. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**(5) (2005) 1038-1044.
142. H. A. Silva, J. C. Carraro, J. Bressan i H. H. Hermsdorff, Relation between uric acid and metabolic syndrome in subjects with cardiometabolic risk. *Einstein.* **13** (2015) 202–208.

143. J.G. Puig i M. A. Martinez, Hyperuricemia, gout and the metabolic syndrome. *Curr. Opin. Rheumatol.* **20**(2) (2008) 187-191.
144. F. Viazzi, D. Garneri, G. Leoncini, A. Gonnella, M. L. Muiesan, E. Ambrosioni, F. V. Costa, G. Leonetti, A. C. Pessina, B. Trimarco, M. Volpe, E. Agabiti Rosei, G. Deferrari i R. Pontremoli, Serum uric acid and its relationship with metabolic syndrome and cardiovascular risk profile in patients with hypertension: insights from the I-DEMAND study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **24**(8) (2014) 921-927.
145. L. Y. Chen, W. H. Zhu, Z. W. Chen, H. L. Dai, J. J. Ren, J. H. Chen, L. Q. Chen i L. Z. Fang, Relationship between hyperuricemia and metabolic syndrome. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* **8**(8) (2007) 593-598.
146. E. S. Ford, C. Li, S. Cook i H. K. Choi, Serum concentrations of uric acid and the metabolic syndrome among US children and adolescents. *Circulation.* **115** (2007) 2526–2532.
147. A. Landar, J. W. Zmijewski, D. A. Dickinson, C. Le Goffe, M. S. Johnson, G. L. Milne, G. Zanoni, G. Vidari, J. D. Morrow i V. M. Darley-Usmar, Interaction of electrophilic lipid oxidation products with mitochondria in endothelial cells and formation of reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **290**(5) (2006) H1777-H1787.
148. H. Pohjantahti-Maaroos, A. Palomaki, P. Kankkunen, R. Laitinen, S. Husgafvel i K. Oksanen, Circulating oxidized low-density lipoproteins and arterial elasticity: comparison between men with metabolic syndrome and physically active counterparts. *Cardiovasc. Diabetol.* **9** (2010) 41.
149. A. S. Kelly, D. R. Jr. Jacobs, A. R. Sinaiko, A. Moran, L. M. Steffen i J. Steinberger, Relation of circulating oxidized LDL to obesity and insulin resistance in children. *Pediatr. Diabetes.* **11**(8) (2010) 552-555.
150. V. Sigurdardottir, B. Fagerberg i J. Hulthe, Circulating oxidized low-density lipoprotein (LDL) is associated with risk factors of the metabolic syndrome and LDL size in clinically healthy 58-year-old men (AIR study). *J. Intern. Med.* **252**(5) (2002) 440-447.
151. P. Holvoet, D. H. Lee, M. Steffes, M. Gross i D. R. Jr. Jacobs, Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome. *JAMA.* **299**(19) (2008) 2287-2293.

152. T. M. van Himbergen, L. J. H. van Tits, M. Roest i A. F. H. Stalenhoef, The story of PON1: how an organophosphate-hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *Neth. J. Med.* **64**(2) (2006) 34-38.
153. M. Krzystek-Korpacka, E. Patryn, K. Hotowy, E. Czapinska, J. Majda, I. Kustrzeba-Wojcicka, A. Noczyńska i A. Gamian, Paraoxonase (PON)-1 activity in overweight and obese children and adolescents: association with obesity-related inflammation and oxidative stress. *Adv. Clin. Exp. Med.* (2013) **22**(2): 229-236.
154. N. Martinelli, R. Micaglio, L. Consoli, P. Guarini, E. Grison, F. Pizzolo, S. Friso, E. Trabetti, P. F. Pignatti, R. Corrocher, O. Olivieri i D. Girelli, Low levels of serum paraoxonase activities are characteristic of metabolic syndrome and may influence the metabolic-syndrome-related risk of coronary artery disease. *Exp Diabetes Res.* **2012** (2012) 231502.
155. H. Yilmaz, N. Sayar, M. Yilmaz, U. Gurkan, C. Sesal, R. Tosu, N. Cakmak, B. Erer, D. Oz, F. Ciloglu i O. Bolca, Serum paraoxonase 1 activity in women with metabolic syndrome. *Kardiol. Pol.* **68**(11) (2010) 1219-1224.
156. D. Čvorišćec, i I. Čepelak (ur.), *Štrausova medicinska biokemija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2009, str. 142.
157. <http://www.shutterstock.com> (preuzeto 9. ožujka 2016 u 12.15 h)
158. <http://www.shutterstock.com> (preuzeto 9. ožujka 2016 u 14.10 h)
159. M. H. Dominiczak i M. J. Caslake Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications, *Ann. Clin. Biochem.* **48**(6) (2011) 498-515.
160. C-C. Luo, W-H. Li, W. H. Moore i L. Chan, Structure and evolution of the apolipoprotein multigene family, *J. Mol. Biol.* **187** (1986) 325-340.
161. R. W. Mahley, T. L. Innerarity, S. C. Jr. Rall i K. H. Weisgraber, Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid. Res.* **25**(12) (1984) 1277-1294.
162. L. A. Pennacchio, M. Olivier, J. A. Hubacek, J. C. Cohen, D. R. Cox, J. C. Fruchart, R. M. Krauss i E. M. Rubin, An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science.* **294** (2001) 169-173.
163. H. N. van der Vliet, M. G. Sammels, A. C. Leegwater, J. H. Levels, P. H. Reitsma, W. Boers i R. A. Chamuleau, Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein

- associated with an early phase liver regeneration. *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 44512-44520.
164. R. B. Weinberg, V. R. Cook, J. A. Beckstead, D. D. O. Martin, J. W. Gallagher, G. S. Shelness i R. O. Ryan, Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 34438-34444.
165. M. Kluger, J. Heeren i M. Merkel, Apoprotein A-V: An important regulator of triglyceride metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* **31** (2008) 281-288.
166. M. Garelnabi, K. Lor, J. Jin, F. Chai i N. Santanam, The paradox of ApoA5 modulation of triglycerides: Evidence from Clinical and Basic Research. *Clin. Biochem.* **46**(1-2) (2013) 12-19.
167. T.M. Forte i R. O. Ryan, Apolipoprotein A5: Extracellular and Intracellular Roles in Triglyceride Metabolism. *Curr. Drug. Targets.* **16**(12) (2015) 1274-1280.
168. P. J. O'Brien, W. E. Alborn, J. H. Sloan, M. Ulmer, A. Boodhoo, M. D. Knierman, A. E. Schultze i R. J. Konrad, The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin. Chem.* **51**(2) (2005) 351-359.
169. M. Merkel, B. Loeffler, M. Kluger, N. Fabig, G. Geppert, L. A. Pennacchio, A. Laatsch and J. Heeren, Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J. Biol. Chem.* **280**(22) (2005) 21553-21560.
170. X. Y. Zheng, S. P. Zhao i H. Yan, The role of apolipoprotein A5 in obesity and the metabolic syndrome. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **88**(2) (2013) 490-498.
171. V. Sharma, T. M. Forte i R. O. Ryan, Influence of apolipoprotein A-V on the metabolic fate of triacylglycerol. *Curr. Opin. Lipidol.* **24**(2) (2013) 153-159.
172. L. A. Pennacchio, M. Olivier, J. A. Hubacek, R. M. Krauss, E. M. Rubin i J. C. Cohen Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum. Mol. Genet.* **11** (2002) 3031-3038.
173. V. Sharma, R. O. Ryan and T. M. Forte, Apolipoprotein A - V dependent modulation of plasma triacylglycerol: a puzzlement. *Biochim. Biophys. Acta.* **1821** (2012) 795-799.

174. M. Soufi, A. M. Sattler, B. Kurt i J. R. Schaefer, Mutation screening of the APOA5 gene in subjects with coronary artery disease. *J. Investig. Med.* **7** (2012) 1015-1019.
175. J. T. Kao, H. C. Wen, K. L. Chien, H. C. Hsu i S. W. Lin, A novel genetic variant in the apolipoprotein A5 gene is associated with hypertriglyceridemia. *Hum. Mol. Genet.* **12** (2003) 2533-2539.
176. Y. J. Huang, Y. L. Lin, C. I. Chiang, C. T. Yen, S. W. Lin i J.T. Kao, Functional importance of apolipoprotein A5 185G in the activation of lipoprotein lipase. *Clin. Chim. Acta.* **413**(1-2) (2012) 246-250.
177. U. Hodoglugil, S. Tanyolaç, D. W. Williamson, Y. Huang i R. W. Mahley, Apolipoprotein A-V: a potential modulator of plasma triglyceride levels in Turks. *J. Lipid. Res.* **47**(1) (2006) 144-153.
178. R. Elosua, J. M. Ordovas, L. A. Cupples, C. Q. Lai, S. Demissie, C. S. Fox, J. F. Polak, P. A. Wolf, R. B. Sr. D'Agostino i C. J. O'Donnell, Variants at the APOA5 locus, association with carotid atherosclerosis, and modification by obesity: the Framingham Study. *J. Lipid. Res.* **47**(5) (2006) 990-996.
179. P. J. Talmud, J. Palmen, W. Putt, L. Lins i S. E. Humphries, Determination of the functionality of common APOA5 polymorphisms. *J. Biol. Chem.* **280**(31) (2005) 28215-28220.
180. X. Prieur, H. Coste i J. C. Rodriguez, The human apolipoprotein AV gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element. *J. Biol. Chem.* **278**(28) (2003) 25468-25480.
181. A. Genoux, H. Dehondt, A. Helleboid-Chapman, C. Duhem, D. W. Hum, G. Martin, L. A. Pennacchio, B. Staels, J. Fruchart-Najib i J. C. Fruchart, Transcriptional Regulation of Apolipoprotein A5 Gene Expression by the Nuclear Receptor ROR $\alpha$ . *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25** (2005) 1186-1192.
182. X. Prieur, F. G. Schaap, H. Coste i J. C. Rodriguez, Hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  regulates the human apolipoprotein AV gene: identification of a novel response element and involvement in the control by peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ , AMP-activated protein kinase, and mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Endocrinol.* **19**(12) (2005) 3107-3125.

183. K. H. Song, Orphan nuclear receptor Nur77 participates in human apolipoprotein A5 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **392**(1) (2010) 63-66.
184. H. Jakel, M. Nowak, E. Moitrot, H. Dehondt, D. W. Hum, L. A. Pennacchio, J. Fruchart-Najib i J. C. Fruchart, The liver X receptor ligand T0901317 down-regulates APOA5 gene expression through activation of SREBP-1c. *J. Biol. Chem.* **279**(44) (2004) 45462-45469.
185. M. Nowak, A. Helleboid-Chapman, H. Jakel, G. Martin, D. Duran-Sandoval, B. Staels, E. M. Rubin, L. A. Pennacchio, M. R. Taskinen, J. Fruchart-Najib i J. C. Fruchart, Insulin-mediated down-regulation of apolipoprotein A5 gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role of upstream stimulatory factor. *Mol. Cell Biol.* **25**(4) (2005) 1537-1548.
186. K. H. Lee, O. Y. Kim, H. H. Lim, Y. J. Lee, Y. Jang i J. H. Lee, Contribution of APOA5-1131C allele to the increased susceptibility of diabetes mellitus in association with higher triglyceride in Korean women. *Metabolism.* **59**(11) (2010) 1583-1590.
187. X. S. Huang, S. P. Zhao, M. Hu, L. Bai, Q. Zhang i W. Zhao, Decreased apolipoprotein A5 is implicated in insulin resistance-related hypertriglyceridemia in obesity. *Atherosclerosis.* **210**(2) (2010) 563-568.
188. M. Ishihara, T. Kujiraoka, T. Iwasaki, M. Nagano, M. Takano, J. Ishii, M. Tsuji, H. Ide, I. P. Miller, N. E. Miller i H. Hattori, A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human plasma apolipoprotein A-V concentration. *J. Lipid. Res.* **46**(9) (2005) 2015-2022.
189. G. Svegliati-Baroni, C. Candelaresi, S. Saccomanno, G. Ferretti, T. Bachetti, M. Marzoni, S. De Minicis, L. Nobili, R. Salzano, A. Omenetti, D. Pacetti, S. Sigmund, A. Benedetti i A. Casini, A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *Am. J. Pathol.* **169**(3) (2006) 846-860.
190. T. M. Forte, X. Shu i R. O. Ryan, The ins (Cell) and outs (Plasma) of plasma apolipoprotein A-V. *J. Lipid. Res.* **50** (2009) S150-S155.



191. J. A. Beckstead, K. Wong, V. Gupta, C. P. Wan, V. R. Cook, R. B. Weinberg, P. M. Weers i R. O. Ryan, The C terminus of apolipoprotein A-V modulates lipid-binding activity. *J. Biol. Chem.* **282**(21) (2007) 15484-15489.
192. K. Wong, J. A. Beckstead, D. Lee, P. M. Weers, E. Guigard, C. M. Kay i R. O. Ryan, The N-terminus of apolipoprotein A-V adopts a helix bundle molecular architecture. *Biochemistry.* **47**(33) (2008) 8768-8774.
193. K. Wong-Mauldin, V. Raussens, T. M. Forte i R. O. Ryan, Apolipoprotein A-V N-terminal domain lipid interaction properties in vitro explain the hypertriglyceridemic phenotype associated with natural truncation mutants. *J. Biol. Chem.* **284** (2009) 33369-33376.
194. A. Lookene, J. A. Beckstead, S. Nilsson, G. Olivecrona i R. O. Ryan, Apolipoprotein A-V-heparin interactions: implications for plasma lipoprotein metabolism. *J. Biol. Chem.* **280**(27) (2005) 25383-25387.
195. K. Mauldin, B. L. Lee, M. Oleszczuk, B. D. Sykes i R. O. Ryan. The carboxyl-terminal segment of apolipoprotein A-V undergoes a lipid-induced conformational change. *Biochemistry.* **49**(23) (2010) 4821-4826.
196. F. G. Schaap, M. C. Nierman, J. F. Berbée, H. Hattori, P. J. Talmud, S. F. Vaessen, P. C. Rensen, R. A. Chamuleau, J. A. Kuivenhoven i A. K. Groen, Evidence for a complex relationship between apoA-V and apoC-III in patients with severe hypertriglyceridemia. *J. Lipid. Res.* **47**(10) (2006) 2333-2339.
197. M. Merkel i J. Heeren, Give me A-five for lipoprotein hydrolysis! *J. Clin. Invest.* **115**(10) (2005) 2694-2696.
198. B. Dorfmeister, W. W. Zeng, A. Dichlberger, S. K. Nilsson, F. G. Schaap, J. A. Hubacek, M. Merkel, J. A. Cooper, A. Lookene, W. Putt, R. Whittall, P. J. Lee, L. Lins, N. Delsaux, M. Nierman, J. A. Kuivenhoven, J. J. Kastelein, M. Vrablik, G. Olivecrona, W. J. Schneider, J. Heeren, S. E. Humphries i P. J. Talmud, Effects of six APOA5 variants, identified in patients with severe hypertriglyceridemia, on *in vitro* lipoprotein lipase activity and receptor binding. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**(10) (2008) 1866-1871.
199. F. G. Schaap, P. C. Rensen, P. J. Voshol, C. Vrins, H. N. van der Vliet, R. A. Chamuleau, L. M. Havekes, A. K. Groen i K. W. van Dijk, ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-

- TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **279**(27) (2004) 27941-27947.
200. S. K. Nilsson, A. Lookene, J. A. Beckstead, J. Gliemann, R. O. Ryan i G. Olivecrona, Apolipoprotein A-V interaction with members of the low density lipoprotein receptor gene family. *Biochemistry.* **46**(12) (2007) 3896-3904.
201. S. Becker, L. Schomburg, K. Renko, M. Tölle, M. van der Giet i U. J. Tietge, Altered apolipoprotein A-V expression during the acute phase response is independent of plasma triglyceride levels in mice and humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**(3) (2006) 833-839.
202. W. Khovidhunkit, P. N. Duchateau, K. F. Medzihradzky, A. H. Moser, J. Naya-Vigne, J. K. Shigenaga, J. P. Kane, C. Grunfeld i K. R. Feingold, Apolipoproteins A-IV and A-V are acute-phase proteins in mouse HDL. *Atherosclerosis.* **176**(1) (2004) 37-44.
203. T. Nabika, S. Nasreen, S. Kobayashi i J. Masuda. The genetic effect of the apoprotein AV gene on the serum triglyceride level in Japanese. *Atherosclerosis.* **165**(2) (2002) 201-204.
204. K. Endo, H. Yanagi, J. Araki, C. Hirano, K. Yamakawa-Kobayashi i S. Tomura, Association found between the promoter region polymorphism in the apolipoprotein A-V gene and the serum triglyceride level in Japanese schoolchildren. *Hum. Genet.* **111**(6) (2002) 570-572.
205. C.Q. Jiang, B. Liu, B. M. Cheung, T. H. Lam, J. M. Lin, Y. Li Jin, X. J. Yue, K. L. Ong, S. Tam, K. S. Wong, B. Tomlinson, K. S. Lam i G. N. Thomas, A single nucleotide polymorphism in APOA5 determines triglyceride levels in Hong Kong and Guangzhou Chinese. *Eur. J. Hum. Genet.* **18**(11) (2010) 1255-1260.
206. H. Grallert, E. M. Sedlmeier, C. Huth, M. Kolz, I. M. Heid, C. Meisinger, C. Herder, K. Strassburger, A. Gehringer, M. Haak, G. Giani, F. Kronenberg, H. E. Wichmann, J. Adamski, B. Paulweber, T. Illig i W. Rathmann, APOA5 variants and metabolic syndrome in Caucasians. *J. Lipid. Res.* **48**(12) (2007) 2614-2621.
207. H. Ye, A. Zhou, Q. Hong, L. Tang, X. Xu, Y. Xin, D. Jiang, D. Dai, Y. Li, D. W. Wang i S. Duan, Positive Association between APOA5 rs662799 Polymorphism and Coronary Heart Disease: A Case-Control Study and Meta-Analysis. *PLoS ONE.* **10**(8) (2015) e0135683.

208. Y. J. Hyun, Y. Jang, J. S. Chae, J. Y. Kim, J. K. Paik, S. Y. Kim, J. Y. Yang, J. M. Ordovas, Y. G. Ko i J. H. Lee, Association of apolipoprotein A5 concentration with serum insulin and triglyceride levels and coronary artery disease in Korean men. *Atherosclerosis*. **205**(2) (2009) 568-573.
209. L. A. Hsu, Y. L. Ko, Q. Chang, C. F. Hu, S. Wu, M. S. Teng, C. L. Wang, W. J. Ho, Y. S. Ko, T. S. Hsu i Y. S. Lee, Genetic variations of apolipoprotein A5 gene is associated with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis*. **185**(1) (2006) 143-149.
210. K. W. Lee, A. F. Ayyobi, J. J. Frohlich i J. S. Hill, APOA5 gene polymorphism modulates levels of triglyceride, HDL cholesterol and FERHDL but is not a risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis*. **176**(1) (2004) 165-172.
211. N. Martinelli, E. Trabetti, A. Bassi, D. Girelli, S. Friso, F. Pizzolo, M. Sandri, G. Malerba, P. F. Pignatti, R. Corrocher i O. Olivieri, The -1131 T>C and S19W APOA5 gene polymorphisms are associated with high levels of triglycerides and apolipoprotein C-III, but not with coronary artery disease: an angiographic study. *Atherosclerosis*. **191**(2) (2007) 409-417.
212. R. De Caterina, P. J. Talmud, P. A. Merlini, L. Foco, R. Pastorino, D. Altshuler, F. Mauri, F. Peyvandi, D. Lina, S. Kathiresan, L. Bernardinelli, D. Ardissino i Gruppo Italiano Aterosclerosi. Strong association of the APOA5-1131 T>C gene variant and early-onset acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*. **214**(2) (2011) 397-403.
213. X. S. Huang, S. P. Zhao, Q. Zhang, L. Bai i M. Hu, Association of plasma apolipoprotein AV with lipid profiles in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*. **204** (2009) 99-102.
214. J. A. Hubacek, J. Kovár, Z. Skodová, J. Pit'ha, V. Lánská i R. Poledne, Genetic analysis of APOAV polymorphisms (T-1131/C, Ser19/Trp and Val153/Met): no effect on plasma remnant particles concentrations. *Clin. Chim. Acta*. **348**(1-2) (2004) 171-175.
215. P. P. Laurila, J. Naukkarinen, K. Kristiansson, S. Ripatti, T. Kauttu, K. Silander, V. Salomaa, M. Perola, P. J. Karhunen, P. J. Barter, C. Ehnholm i L. Peltonen, Genetic association and interaction analysis of USF1 and APOA5 on lipid levels and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**(2) (2010) 346-352.

216. Z. K. Liu, M. Hu, L. Baum, G. N. Thomas i B. Tomlinson, Associations of polymorphisms in the apolipoprotein A1/C3/A4/A5 gene cluster with familial combined hyperlipidaemia in Hong Kong Chinese. *Atherosclerosis*. **208**(2) (2010) 427-432.
217. I. Coca-Prieto, P. Valdivielso, G. Olivecrona, M. J. Ariza, J. Rioja, P. Font-Ugalde, C. García-Arias i P. González-Santos, Lipoprotein lipase activity and mass, apolipoprotein C-II mass and polymorphisms of apolipoproteins E and A5 in subjects with prior acute hypertriglyceridaemic pancreatitis. *BMC Gastroenterol.* **9** (2009) 46.
218. D. Evans, A. Bode, G. von der Lippe, F. U. Beil i W. A. Mann, Cerebrovascular atherosclerosis in type III hyperlipidemia is modulated by variation in the apolipoprotein A5 gene. *Eur. J. Med. Res.* **16**(2) (2011) 79-84.
219. A. Maász, P. Kisfali, K. Horvatovich, M. Mohás, L. Markó, V. Csöngéi, B. Faragó, L. Járomi, L. Magyarai, E. Sáfrány, C. Sipeky, I. Wittmann i B. Melegh, Apolipoprotein A5 T-1131C Variant Confers Risk for Metabolic Syndrome. *Pathol. Oncol. Res.* **13**(3) (2007) 243-247.
220. P. Kisfali, M. Mohás, A. Maász, N. Polgár, F. Hadarits, L. Markó, P. Brasnyó, K. Horvatovich, T. Oroszlán, Z. Bagosi, Z. Bujtor, B. Gasztonyi, J. Rinfel, I. Wittmann i B. Melegh, Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in patients with the metabolic syndrome. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **20** (2010) 505-511.
221. K. L. Ong, C. Q. Jiang, B. Liu, Y. L. Jin, A. W. Tso, S. Tam, K. S. Wong, B. Tomlinson, B. M. Cheung, J. M. Lin, X. J. Yue, K. S. Lam, T. H. Lam i G. N. Thomas, Association of a genetic variant in the apolipoprotein A5 gene with the metabolic syndrome in Chinese. *Clin. Endocrinol.* **74**(2) (2011) 206-213.
222. M. Ajjemami, S. Ouattou, H. Charoute, M. Fakiri, H. Rhaissi, H. Benrahma, H. Rouba i A. Barakat, Haplotype analysis of the Apolipoprotein A5 gene in Moroccan patients with the metabolic syndrome. *J. Diabetes Metab. Disord.* **14** (2015) 29.
223. J. Dallongeville, D. Cottel, A. Wagner, P. Ducimetière, J. B. Ruidavets, D. Arveiler, A. Bingham, J. Ferrières, P. Amouyel i A. Meirhaeghe, The APOA5 Trp19 allele is associated with metabolic syndrome via its association with plasma triglycerides. *BMC Med. Genet.* **9** (2008) 84.

224. Y. Yamada, S. Ichihara, K. Kato, T. Yoshida, K. Yokoi, H. Matsuo, S. Watanabe, N. Metoki, H. Yoshida, K. Satoh, Y. Aoyagi, A. Yasunaga, H. Park, M. Tanaka, W. Lee i Y. Nozawa, Genetic risk for metabolic syndrome: Examination of candidate gene polymorphisms related to lipid metabolism in Japanese people *J. Med. Genet.* **45**(1) (2008) 22-28.
225. F. He, X. Xu, D. Hu, S. Ma, L. Tang, W. Fan, B. Chen, J. Zhou i Z. Ma, Apolipoprotein A5-12238 T>G gene polymorphism and risk factors for metabolic syndrome in the Guo Shan Yao and the Han populations. *Clin. Chem. Lab. Med.* **49** (2011) 1755 – 1757.
226. P. Kisfali, M. Mohás, A. Maasz, F. Hadarits, L. Markó, K. Horvatovich, T. Oroszlán, Z. Bagosi, Z. Bujtor, B. Gasztonyi, I. Wittmann i B. Melegh, Apolipoprotein A5 IVS3+476A Allelic Variant Associates With Increased Triglyceride Levels and Confers Risk for Development of Metabolic Syndrome in Hungarians. *Circ. J.* **72** (2008) 40-43.
227. L. S. Niculescu, J. Fruchart-Najib, J. C. Fruchart i A. Sima, Apolipoprotein A-V gene polymorphisms in subjects with metabolic syndrome. *Clin. Chem. Lab. Med.* **45** (2007) 1133-1139.
228. J. C. Sacchetini, J. I. Gordon i L. J. Banaszak, The structure of crystalline Escherichia coli-derived rat intestinal fatty acid-binding protein at 2.5-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **263**(12) (1988) 5815-5819.
229. H. H. Lin, L. Y. Han, H. L. Zhang, C. J. Zheng, B. Xie i Y. Z. Chen, Prediction of the functional class of lipid binding proteins from sequence-derived properties irrespective of sequence similarity. *J. Lipid Res.* **47**(4) (2006) 824-831.
230. J. F. Glatz, Lipids and lipid binding proteins: a perfect match. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **93** (2015) 45-49.
231. V. Niggli, Structural properties of lipid binding sites in cytoskeletal proteins. *Trends Biochem. Sci.* **26** (2001) 604–611.
232. A. M. Marcelino, R. G. Smock i L. M. Gierasch, Evolutionary coupling of structural and functional sequence information in the intracellular lipid-binding protein family. *Proteins.* **63** (2006) 373-384.
233. R. L. Smathers i D. R. Petersen, The human fatty acid-binding protein family: Evolutionary divergences and functions. *Human Genomics.* **5**(3) (2011) 170-191.

234. D. R. Flower, Structural relationship of streptavidin to the calycin protein superfamily. *FEBS Lett.* **333** (1993) 99-102.
235. F. G. Schaap, G. J. van der Vusse i J. F. Glatz, Evolution of the family of intracellular lipid binding proteins in vertebrates. *Mol. Cell. Biochem.* **239** (2002) 69-77.
236. T. Hanhoff, C. Lücke i F. Spener, Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins. *Mol. Cell. Biochem.* **239**(1-2) (2002) 45-54.
237. J. Storch i L. McDermott, Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. *J Lipid Res.* **50**(Suppl) (2009) S126–S131.
238. J. Storch i A. E. Thumser, Tissue-specific Functions in the Fatty Acid-binding Protein Family. *J. Biol. Chem.* **285** (2010) 32679-32683.
239. A. Chmurzynska, The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Function, structure and polymorphism. *J. Appl. Genet.* **47** (2006) 39-48.
240. J. C. Sacchettini, J. I. Gordon i L. J. Banaszak, Crystal structure of rat intestinal fatty-acid-binding protein. Refinement and analysis of the Escherichia coli-derived protein with bound palmitate. *J. Mol. Biol.* **208** (1989) 327-339.
241. M. Furuhashi i G. S. Hotamisligil, Fatty acid-binding proteins: Role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **7** (2008) 489-503.
242. G. V. Richieri, R. T. Ogata, A. W. Zimmerman, J. H. Veerkamp i A. M. Kleinfeld, Fatty acid binding proteins from different tissues show distinct patterns of fatty acid interactions. *Biochemistry.* **39** (2000) 7197-7204.
243. G. V. Richieri, R. T. Ogata i A. M. Kleinfeld, Fatty acid interactions with native and mutant fatty acid binding proteins. *Mol. Cell Biochem.* **192** (1999) 77-85.
244. P. Besnard, I. Niot, H. Poirier, L. Clement i A. Bernard, New insights into the fatty acid-binding protein (FABP) family in the small intestine. *Mol. Cell Biochem.* **239** (2002) 139-147.
245. E. P. Weiss, M. D. Brown, A. R. Shuldiner i J. M. Hagberg, Fatty acid binding protein-2 gene variants and insulin resistance: gene and gene-environment interaction effects. *Physiol. Genomics.* **10**(3) (2002) 145-157.
246. F. Zhang, C. Lücke, L. J. Baier, J. C. Sacchettini i J. A. Hamilton, Solution structure of human intestinal fatty acid binding protein: implications for ligand entry and exit. *J. Biomol. NMR.* **9**(3) (1997) 213-228.

247. J. B. Lowe, J. C. Sacchettini, M. Laposata, J. J. McQuillan i J. I. Gordon, Expression of rat intestinal fatty acid-binding protein in *Escherichia coli*. Purification and comparison of ligand binding characteristics with that of *Escherichia coli*-derived rat liver fatty acid-binding protein. *J. Biol. Chem.* **262** (1987) 5931-5937.
248. G. Nemezc, T. Hubbell, J. R. Jefferson, J. B. Lowe i F. Schroeder, Interaction of fatty acids with recombinant rat intestinal and liver fatty acid-binding proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **286** (1991) 300-309.
249. M. E. Hodsdon i D. P. Cistola, Ligand binding alters the backbone mobility of intestinal fatty acid-binding protein as monitored by <sup>15</sup>N NMR relaxation and <sup>1</sup>H exchange. *Biochemistry.* **36** (1997) 2278-2290.
250. A. M. Gajda i J. Storch, Enterocyte Fatty Acid Binding Proteins (FABPs): Different Functions of Liver- and Intestinal- FABPs in the Intestine *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **93** (2015) 9–16.
251. F. Zhang, C. Lücke, L. J. Baier, J. C. Sacchettini i J. A. Hamilton, Solution structure of human intestinal fatty acid binding protein with a naturally-occurring single amino acid substitution (A54T) that is associated with altered lipid metabolism. *Biochemistry.* **42**(24) (2003) 7339-7347.
252. L. J. Baier, J. C. Sacchettini, W. C. Knowler, J. Eads, G. Paolisso, P. A. Tataranni, H. Mochizuki, P. H. Bennett, C. Bogardus i M. Prochazka, An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **95**(3) (1995) 1281-1287.
253. A. Georgopoulos, O. Aras i M. Y. Tsai, Codon-54 polymorphism of the fatty acid-binding protein 2 gene is associated with elevation of fasting and postprandial triglyceride in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**(9) (2000) 3155-3160.
254. R. P. Green, S. M. Cohn, J. C. Sacchettini, K. E. Jackson i J. I. Gordon, The mouse intestinal fatty acid binding protein gene: nucleotide sequence, pattern of developmental and regional expression, and proposed structure of its protein product. *DNA Cell Biol.* **11** (1992) 31-41.
255. D. A. Sweetsers, E. H. Birkenmeier, I. J. Klisak, S. Zollman, R. S. Sparkes, T. Mohandas, A. J. Lusis i J. I. Gordon, The human and rodent intestinal fatty acid

- binding protein genes. A comparative analysis of their structure, expression, and linkage relationships. *J. Biol. Chem.* **262**(33) (1987) 16060-16071.
256. T. Ishii, H. Hirose, T. Kawai, K. Hayashi, H. Maruyama, I. Saito i T. Saruta, Effects of intestinal fatty acid-binding protein gene Ala54Thr polymorphism and beta3-adrenergic receptor gene Trp64Arg polymorphism on insulin resistance and fasting plasma glucose in young to older Japanese men. *Metabolism.* (2001) **50** 1301-1307.
257. J. J. Agren, R. Valve, H. Vidgren, M. Laakso i M. Uusitupa, Postprandial lipemic response is modified by the polymorphism at codon 54 of the fatty acid-binding protein 2 gene. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18** (1998) 1606-1610.
258. P. Humphreys, M. McCarthy, J. Tuomilehto, E. Tuomilehto-Wolf, I. Stratton, R. Morgan, A. Rees, D. Owens, J. Stengård, A. Nissinen, G. Hitman, R. C. Turner i S. O'Rahilly, Chromosome 4q locus associated with insulin resistance in Pima Indians. Studies in three European NIDDM populations. *Diabetes.* **43** (1994) 800-804.
259. D. A. de Luis, E. Ruiz, M. Cordero, C. Munoz, M. A. Penacho, P. Iglesias, A. Lopez Guzman, A. Maldonado, L. San Martin, V. Puigdevall, E. Romero, M. Gonzalez Sagrado, O. Izaola i R. Conde, Polymorphism Ala54Thr of fatty acid-binding protein 2: Allelic frequencies and influence on cardiovascular risk factors in a multicenter study of Castilla y Leon. *Ann. Nutr. Metab.* **57** (2010) 163-168.
260. A. M. Chamberlain, P. J. Schreiner, M. Fornage, C. M. Loria, D. Siscovick i E. Boerwinkle, Ala54Thr polymorphism of the fatty acid binding protein 2 gene and saturated fat intake in relation to lipid levels and insulin resistance: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Metabolism.* **58**(9) (2009) 1222-1228.
261. T. Zhao, M. Nzekebaloudou i J. Iv, Ala54Thr polymorphism of fatty acid-binding protein 2 gene and fasting blood lipids: a meta-analysis. *Atherosclerosis.* **210**(2) (2010) 461-467.
262. D. A. de Luis, M. Gonzales Sagrado, R. Aller, O. Izaola i R. Conde, Metabolic syndrome and ALA54THR polymorphism of fatty acid-binding protein 2 in obese patients. *Metabolism.* **60**(5) (2011) 664-668.



263. T. Zhao, J. Zhao, J. Iv i M. Nzekebaloudou, Meta-analysis on the effect of the Ala54Thr polymorphism of the fatty acid-binding protein 2 gene on body mass index. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **21**(10) (2011) 823-829.
264. T. Zhao, J. Zhao i W. Yang, Association of the fatty acid-binding protein 2 gene Ala54Thr polymorphism with insulin resistance and blood glucose: a meta-analysis in 13451 subjects. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **26**(5) (2010) 357-364.
265. A. Pizent, M. Pavlović, J. Jurasović, S. Dodig, D. Pašalić i R. Mujagić, Antioxidants, trace elements and metabolic syndrome in elderly subjects. *J. Nutr. Health Aging.* **14**(10) (2010) 866-871.
266. J. S. Weiner i J. A. Lourie, *Practical Human Biology*, Academic Press, London, 1981
267. Mean Arterial Pressure (MAP) Calculator. <http://www.globalrph.com/map.htm> (pristupano 29. veljače 2012)
268. W. T. Friedewald, R. I. Levy i D. S. Fredrickson, Estimation of the concentration of low density lipoprotein-cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **18**(6) (1972) 499-502.
269. Biosprint 15 DNA Handbook,  
<http://www1.qiagen.com/Products/Automation/BioSprint15.aspx?ShowInfo=1>
270. M. A. Innis i D. H. Gelfand, Optimization of PCRs, u *PCR Protocols* M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White (ur.), Academic Press, New York, 1990.
271. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts i P. Walter. *Molecular biology of the cell*, 4th ed., Garland Science, New York, 2002, str. 508.
272. [http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/G2938-90015\\_QuickDNA1000.pdf](http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/G2938-90015_QuickDNA1000.pdf)
273. <http://www.genomics.agilent.com/CollectionSubpage.aspx?PageType=Product&SubPageType=ProductDetail&PageID=1635>)
274. <http://www.genomics.agilent.com>
275. T. Kishino, K. Watanabe, T. Urata, M. Takano, T. Uemura, K. Nishikawa, Y. Mine, M. Matsumoto, K. Ohtsuka, H. Ohnishi, H. Mori, S. Takahashi, H. Ishida i T. Watanabe, Visceral fat thickness in overweight men correlates with alterations in serum fatty acid composition. *Clin Chim Acta.* **398**(1-2) (2008) 57-62

276. T. R. Gaunt, S. Rodriguez i I. N. M. Day, Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool 'CubeX'. *BMC Bioinformatics*. **8** (2007) 428.
277. B. Can Demirdögen, E. Şahin, A. Türkanoglu Özçelik, S. Bek, Ş. Demirkaya i O. Adali, Apolipoprotein A5 polymorphisms in Turkish population: association with serum lipid profile and risk of ischemic stroke. *Mol. Biol. Rep.* **39**(12) (2012) 10459-10468.
278. C. N. Ferreira, M. G. Carvalho, A. P. Fernandes, I. R. Santos, K. F. Rodrigues, A. M. Lana, C. R. Almeida, A. A. Loures-Vale, K. B. Gomes i M. O. Sousa, The polymorphism -1131T>C in apolipoprotein A5 gene is associated with dyslipidemia in Brazilian subjects. *Gene*. **516**(1) (2013) 171-175.
279. F. Hadarits, P. Kisfali, M. Mohás, A. Maász, K. Sümegi, M. Szabó, K. Hetyésy, A. Valasek, I. Janicsek, I. Wittmann i B. Melegh, Stepwise positive association between APOA5 minor allele frequencies and increasing plasma triglyceride quartiles in random patients with hypertriglyceridemia of unclarified origin. *Pathol. Oncol. Res.* **17**(1) (2011) 39-44.
280. Triglyceride Coronary Disease Genetics Consortium, Emerging Risk Factors Collaboration, N. Sarwar, M. S. Sandhu, S. L. Ricketts, A. S. Butterworth, E. Di Angelantonio, S. M. Boekholdt, W. Ouwehand, H. Watkins, N. J. Samani, D. Saleheen, D. Lawlor, M. P. Reilly, A. D. Hingorani, P. J. Talmud i J. Danesh, Triglyceride-mediated pathways and coronary disease: collaborative analysis of 101 studies. *Lancet*. **375**(9726) (2010) 1634-1639.
281. D. Evans, J. Aberle i F. U. Beil, Resequencing the apolipoprotein A5 (APOA5) gene in patients with various forms of hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*. **219**(2) (2011) 715-720.
282. L. Feher Turković, A. Pizent, S. Dodig, M. Pavlovic i D. Pasalic, *FABP2* gene polymorphism and metabolic syndrome in elderly people of Croatian descent. *Biochem. Med.* **22**(2) (2012) 217-224.
283. K. W. van Dijk, P. C. Rensen, P. J. Voshol i L. M. Havekes, The role and mode of action of apolipoproteins CIII and AV: synergistic actors in triglyceride metabolism? *Curr. Opin. Lipidol.* **15**(3) (2004) 239-246.

284. S. P. McColley, A. Georgopoulos, L. R. Young, M. S. Kurzer, J. B. Redmon i S. K. Raatz, A high-fat diet and the threonine-encoding allele (Thr54) polymorphism of fatty acid-binding protein 2 reduce plasma triglyceride-rich lipoproteins. *Nutr. Res.* **31**(7) (2011) 503-508.
285. M. Gastaldi, S. Dizièere, C. Defoort, H. Portugal, D. Lairon, M. Darmon i R. Planells, Sex-specific association of fatty acid binding protein 2 and microsomal triacylglycerol transfer protein variants with response to dietary lipid changes in the 3-mo Medi-RIVAGE primary intervention study. *Am. J. Clin. Nutr.* **86**(6) (2007) 1633-1641.
286. D. A. de Luis, E. Ruiz, M. Cordero, C. Munoz, M. A. Penacho, P. Iglesias, A. Lopez Guzman, A. Maldonado, L. San Martin, V. Puigdevall, E. Romero, M. Gonzalez Sagrado, O. Izaola i R. Conde, Polymorphism Ala54Thr of fatty acid-binding protein 2: Allelic frequencies and influence on cardiovascular risk factors in a multicenter study of Castilla y Leon. *Ann. Nutr. Metab.* **57** (2010) 163-168.
287. M. Oguri, K. Kato, K. Yokoi, T. Itoh, T. Yoshida, S. Watanabe, N. Metoki, H. Yoshida, K. Satoh, Y. Aoyagi, Y. Nishigaki, M. Tanaka, Y. Nozawa i Y. Yamada, Association of genetic variants with myocardial infarction in Japanese individuals with metabolic syndrome. *Atherosclerosis.* **206**(2) (2009) 486-493.
288. G. Riccardi i A. A. Rivellese, Dietary treatment of the metabolic syndrome--the optimal diet. *Br. J. Nutr.* **83**(Suppl 1) (2000) S143-148.
289. E. Warensjö, U. Risérus i B. Vessby, Fatty acid composition of serum lipids predicts the development of the metabolic syndrome in men. *Diabetologia.* **48**(10) (2005) 1999-2005.
290. J. Ma, A. R. Folsom, E. Shahar i J. H. Eckfeldt, Plasma fatty acid composition as an indicator of habitual dietary fat intake in middle-aged adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**(3) (1995) 564-571.
291. C-Q. Lai, D. Corella, S. Demissie, A. Cupples, X. Adiconis, Y. Zhu, L. D. Parnell, K. L. Tucker i J. M. Ordovas, Dietary intake of n-6 fatty acids modulates effect of apolipoprotein A5 gene on plasma fasting triglycerides, remnant lipoprotein concentrations, and lipoprotein particle size: the Framingham Heart Study. *Circulation.* **113**(17) (2006) 2062-2070.

292. K. J. Williams i I. Tabas, The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr. Opin. Lipidol.* **9**(5) (1998) 471-474.
293. T. Domínguez-Reyes, C. C. Astudillo-López, L. Salgado-Goytia, J. F. Muñoz-Valle, A. B. Salgado-Bernabé, I. P. Guzmán-Guzmán, N. Castro-Alarcón, M. E. Moreno-Godínez i I. Parra-Rojas, Interaction of dietary fat intake with APOA2, APOA5 and LEPR polymorphisms and its relationship with obesity and dyslipidemia in young subjects. *Lipids Health Dis.* **14** (2015) 106.
294. H. Sampath i J. M. Ntambi, Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **25** (2005) 317-340.
295. R. J. T. Mocking, A. Lok, J. Assies, M. W. J. Koeter, I. Visser, E. Ruhe, C. L. H. Bockting i A. H. Schene, Ala54Thr fatty acid-binding protein 2 (FABP2) polymorphism in recurrent depression: associations with fatty acid concentrations and waist circumference. *PLoS ONE.* **8**(12) (2013) 82980.
296. R. E. Pratley, L. Baier, D. A. Pan, A. D. Salbe, L. Storlien, E. Ravussin i C. Bogardus, Effects of an Ala54Thr polymorphism in the intestinal fatty acid-binding protein on responses to dietary fat in humans. *J. Lipid. Res.* **41**(12) (2000) 2002-2008.
297. H. M. Vidgren, R. H. Sipiläinen, S. Heikkinen, M. Laakso i M.I. Uusitupa, Threonine allele in codon 54 of the fatty acid binding protein 2 gene does not modify the fatty acid composition of serum lipids in obese subjects. *Eur. J. Clin. Invest.* **27**(5) (1997) 405-408.
298. A. T. Erkkilä, V. Lindi, S. Lehto, K. Pyörälä, M. Laakso i M. I. Uusitupa, Variation in the fatty acid binding protein 2 gene is not associated with markers of metabolic syndrome in patients with coronary heart disease. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **12**(2) (2002) 53-59.
299. J. Y. Kim, O. Y. Kim, S. J. Koh, Y. Jang, S. S. Yun, J. M. Ordovas i J. H. Lee, Comparison of low-fat meal and high-fat meal on postprandial lipemic response in non-obese men according to the -1131T>C polymorphism of the apolipoprotein A5 (APOA5) gene (randomized cross-over design). *J. Am. Coll. Nutr.* **25**(4) (2006) 340-347.
300. J. J. Agren, H. M. Vidgren, R. S. Valve, M. Laakso i M. I. Uusitupa, Postprandial responses of individual fatty acids in subjects homozygous for the threonine- or

---

alanine-encoding allele in codon 54 of the intestinal fatty acid binding protein 2 gene. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**(1) (2001) 31-35.

## § 9. ŽIVOTOPIS

Lana Feher Turković rođena je 11. siječnja 1973. godine u Varaždinu u kojem je pohađala osnovnu i srednju školu. Studij prehrambene tehnologije, smjer Biokemijsko inženjerstvo upisala je 1991. godine pri Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 1997. godine. Po završetku studija, od 1997. do kraja 2005. godine radi kao znanstveni novak na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i upisuje poslijediplomski studij kemije, smjer Biokemija pri Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2010. brani magistarski rad iz područja prirodnih znanosti. Od 1. ožujka 2007. godine do danas zaposlena je na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu kao predavač, odnosno viši predavač.

**Popis radova kandidatkinje****Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:**

1. Pašalić, Daria; Pauković, Paulina; Cvijetić, Selma; Pizent, Alica; Jurasović, Jasna; Milković-Kraus, Sanja; Dodig, Slavica; Muck-Šeler, Dorotea; Mustapić, Maja; Pivac, Nela; Feher Turković, Lana; Pavlović, Mladen. Prostate cancer in elderly Croatian men: 5-HT genetic polymorphisms and the influence of androgen deprivation therapy on osteopenia-a pilot study. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 16 (2012) , 6; 598-604 (članak, znanstveni).
2. Ribar, Slavica; Feher Turković, Lana; Karmelić, Ivana; Mesarić, Marko. Sphingoid bases in infant formulas. *Food Chemistry*. 103 (2007), 1; 173-180 (članak, znanstveni).

**Znanstveni radovi u drugim časopisima:**

1. Feher Turković, Lana; Pizent, Alica; Dodig, Slavica; Pavlović, Mladen; Pašalić, Daria. FABP 2 gene polymorphism and metabolic syndrome in elderly people of Croatian descent. *Biochemia Medica*. 22 (2012), 2; 217-224 (članak, znanstveni).
2. Pašalić, Daria; Marinković, Natalija; Feher-Turković, Lana. Uric acid as one of the important factors in multifactorial disorders - facts and controversies. // *Biochemia Medica*. 22 (2012) , 1; 63-75 (pregledni rad, znanstveni).

**Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu:**

1. Feher Turković, Lana; Pašalić, Daria; Delaš, Ivančica. Fatty acid serum composition and genetic polymorphisms of fatty acid binding protein-2 in elderly subjects with metabolic syndrome // The 3rd EFLM-UEMS Congress Laboratory Medicine at the Clinical Interface:abstracts; u: *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 52 (2014) (11) ; Bone Disease & Calcium Metabolism, W156 / Plebani, M. (ur.). Berlin: De Gruyter, 2014. eA290-eA290 (poster,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).
2. Karmelić, Ivana; Ivušić, Franjo; Ribar, Slavica; Feher Turković, Lana; Marić, Vladimir; Mesarić, Marko. Influence of growth phase and zeolite on the sphingoid bases biosynthesis in waste brewer's yeast // Abstracts of the 31st FEBS Congress Molecules in Health and Disease : Poster Presentations ; u: *The FEBS Journal* 297 (2006) S1 ; 77-367 / Perhman, Richard (ur.). Blackwell Publishing, 2006. 297-298 (poster,međunarodna recenzija,sažetak,znanstveni).

**Sažeci u zbornicima skupova:**

1. Feher Turković, Lana; Pavlović, Mladen; Pašalić, Daria. Apolipoprotein A5 genetic polymorphisms and fasting serum lipidogram in elderly subjects with MetS // Abstracts of the 2nd European Joint Congress of EFLM and UEMS and 7th Congress of the Croatian Society for Medical Biochemistry and Laboratory medicine (CSMBLM) : Laboratory Medicine at the Clinical Interface : Posters ; u: *Biochemia Medica* 22 (2012) 3 ; A54-A204 / Šimundić, Ana-Maria (ur.). Zagreb : Medicinska naklada, 2012. A157-A157 (poster, sažetak, znanstveni).
2. Feher Turković, Lana; Ribar, Slavica; Karmelić, Ivana; Mesarić, Marko. Role of dietary ganglioside GM1 and zeolite clinoptilolite in liver of 1, 2-dimethylhydrazine-treated CF1 mice // *Book of Abstracts of the HDBMB 2004* / Dumić, Jerka (ur.). Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2004. 73 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
3. Ribar, Slavica; Feher Turković, Lana; Karmelić, Ivana; Mesarić, Marko. Sphingolipids in Human Milk and Infant Formulas // *New Achievements in Chromatography* / Šegudović, Nikola (ur.). Zagreb, 2004. 87 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
4. Ribar, Slavica; Mesarić, Marko; Feher Turković, Lana; Karmelić, Ivana. Sphingoid bases in milk and dairy products // *Book of Abstracts of the HDBMB 2004* / Dumić, Jerka (ur.), Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2004. 115 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).